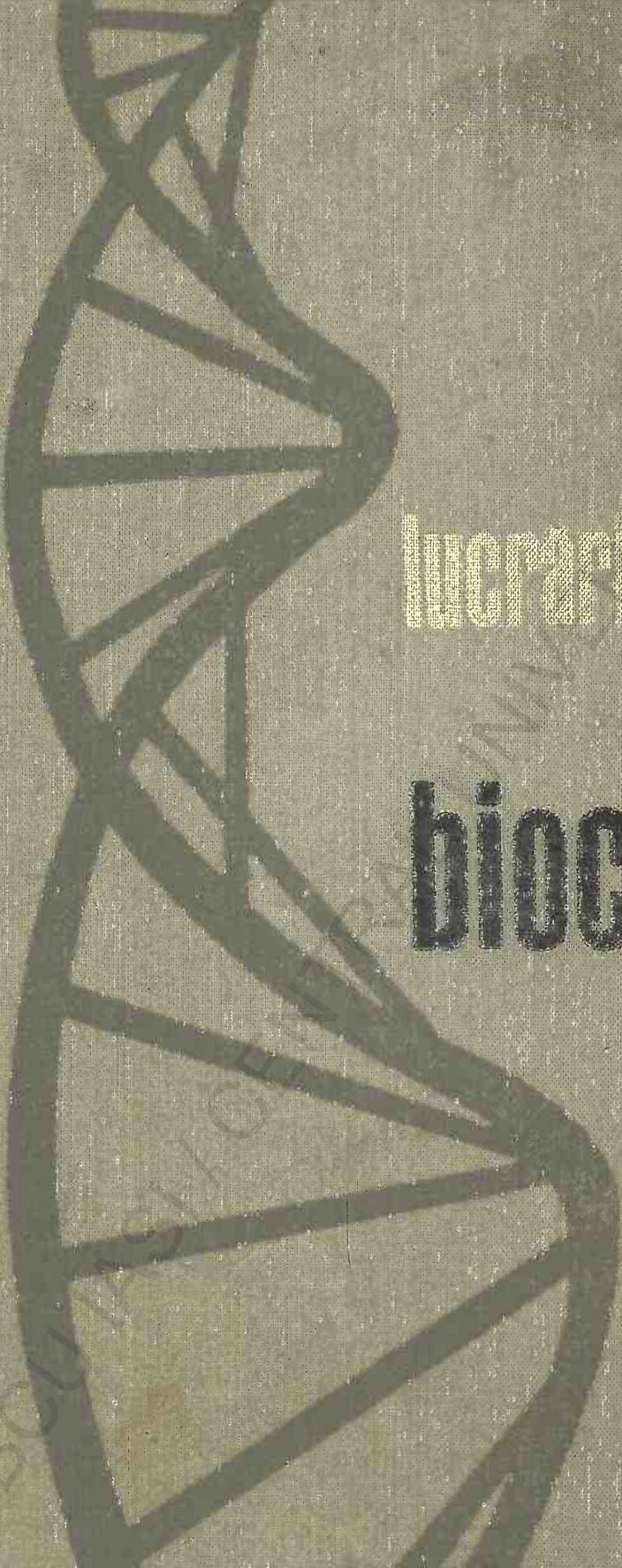
I. A. DUMITRU



lucrări practice de biochimie

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

UNIVERSITATEA BUCUREȘTI
FACULTATEA DE BIOLOGIE

dr. I. F. DUMITRU

lucrări practice de biochimie

175763
B.C.U. - IASI

EDITURA
DIDACTICĂ
ȘI
PEDAGOGICĂ,
BUCUREȘTI-1967

20 FEB. 1968

BCU IASI - CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

I 6836
BIBLIOTECA FACULTĂȚII DE CHIMIE
T III-2507

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

PREFAȚĂ

Lucrarea prezintă descrierea succintă a principalelor metode de identificare și dozare a componentelor biochimice importante în organismele vii.

Această lucrare se adresează, în primul rînd, studenților care urmează cursurile facultăților de biologie — anul II —, precum și studenților de la secția de biochimie a facultății de chimie — anul III. Metodele descrise sînt grupate pe capitole mari și urmăresc îndeaproape programa analitică a cursului de biochimie generală, oferind studenților posibilitatea de a-și forma deprinderi practice paralel cu însușirea cunoștințelor teoretice expuse la curs.

Concomitent cu descrierea unor metode moderne, care s-au impus în mod deosebit în ultimul timp, am considerat utilă și expunerea unei serii de metode biochimice clasice. La fiecare metodă descrisă în acest volum s-au făcut referiri asupra domeniului de aplicație și s-a insistat, în mod deosebit, asupra criteriilor care stau la baza calculului rezultatelor. Metodele, tehnicile și reacțiile descrise în lucrarea de față, după rețetele originale apărute în reviste periodice sau în monografii de specialitate, au fost verificate și aplicate cu bune rezultate la ședințele de lucrări cu studenții. Acest fapt ne-a dat posibilitatea ca în redactarea materialului să ne oprim asupra unor aspecte metodice în aparență minore, dar care sînt mai greu asimilate de cursanți.

În selecționarea materialului am fost călăuziți de ideea formării la cursanți a unei imagini corecte despre principalele etape ale analizei biochimice (separare, reacții de identificare a principalelor grupări funcționale, determinări cantitative).

Acest mod de prezentare contribuie, pe de o parte, la formarea unei imagini de ansamblu asupra metodelor specifice bio-

BCU IAȘI · UNIVERSITY LIBRARY

chimiei, iar pe de altă parte, ajută pe studenții ce folosesc lucrarea de a consulta mai ușor și alte lucrări similare, de specialitate.

Exprimăm pe această cale mulțumirile noastre tuturor colegilor care au văzut lucrarea în manuscris și care au contribuit prin sugestiile lor la definitivarea ei. Totodată ne exprimăm speranța că lucrarea umple un gol resimțit de mult în învățământul biochimic universitar *și rugăm să ne fie transmise toate observațiile referitoare la conținutul și forma de prezentare a lucrării.*

Autorul

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

CUPRINS

Prefață 3

Cap. 1. PROTEIDE 11

1.1. Noțiuni generale 11

1.2. Metode de separare a proteidelor 13

1.2.1. Separarea cazeinei din lapte. Metoda Hammersten . . . 13

1.2.2. Separarea proteinelor vegetale 14

1.2.3. Separarea dezoxiribonucleoproteidelor și acidului dezoxiribonucleic din țesuturile animale. Metoda Hammersten . . . 14

1.2.4. Separarea acizilor nucleici (*ARN* și *ADN*) din țesuturile animale. Metoda Tsuboi și Stowell 17

1.2.5. Separarea acizilor nucleici din țesuturi. Metoda Kirby . . . 20

1.2.6. Separarea acidului ribonucleic. Metoda Chantrenne . . . 23

1.2.7. Separarea oligonucleotidelor. Metoda Little și Butler . . 26

1.2.8. Separarea nucleotidelor pirimidinice. Metoda Loring, Roll și Pierce 29

1.2.9. Separarea nucleotidelor purinice. Metoda Buell 35

1.2.10. Separarea nucleotidelor pe cale enzimatică. Metoda Hurst, Little și Butler 38

1.2.11. Separarea nucleozidelor pe cale enzimatică. Metoda Klein . 40

1.2.12. Separarea acidului adenilic. Metoda Laufer și Stewart 44

1.3. Proprietăți fizico-chimice ale proteidelor 46

1.3.1. Determinarea punctului izoelectric 46

1.3.2. Reacții de precipitare 50

1.3.3. Separarea fracțiilor proteice prin metoda salifierii 55

1.4. Reacții calitative specifice pentru proteine 56

1.4.1. Identificarea proteinelor în lichidele biologice și preparatele biochimice 56

1.4.2. Metode de identificare a aminoacizilor ciclici în hidrolizatele proteice 58

BCU IAȘI UNIVERSITY LIBRARY

1.4.3. Metode de identificare a aminoacizilor aciclici în hidrolizatele proteinelor 64
1.4.4. Identificarea aminoacizilor în hidrolizatele proteinelor. Metoda cromatografiei pe hîrtie 65
1.4.5. Reacţii de culoare specifice pentru glucoproteide 69

1.5. Identificarea fierului, sulfului, fosforului şi azotului în compoziţia proteinelor 70
1.5.1. Identificarea fierului în preparatul de hemoglobină 70
1.5.2. Identificarea sulfului în ovalbumină 71
1.5.3. Identificarea fosforului în cazeină 72
1.5.4. Identificarea azotului 75

1.6. Analiza cantitativă 76
1.6.1. Determinarea azotului total şi proteic. Metoda Kjeldahl . . 76
1.6.2. Determinarea azotului restant. Metoda Conway 82
1.6.3. Determinarea azotului total, după metoda Kjeldahl modificată de Abderhalden şi Fodor 84
1.6.4. Determinarea azotului aminoacizilor. Metoda Sörensen 85
1.6.5. Determinarea proteinelor. Metoda Robinson şi Hogden 87
1.6.6. Determinarea proteinelor totale în serul sanguin. Metoda Phillips, van Slyke 93
1.6.7. Determinarea albuminelor şi globulinelor din serul sanguin. Metoda Kingsbey 96
1.6.8. Separarea fracţiilor proteice din serul sanguin. Metoda electroforezei pe hîrtie 97
1.6.9. Determinarea acizilor nucleici în materialul biologic. Metoda Schmidt şi Thannhauser 101
1.6.10. Determinarea acidului ribonucleic în ţesuturile animale. Metoda Webb 104
1.6.11. Determinarea simultană a acizilor nucleici în ţesuturile animale şi vegetale. Metoda Spirin 105
1.6.12. Electroforeza pe hîrtie a acizilor nucleici şi analiza chimică a compoziţiei lor. Metoda Brown şi Diurnbaum . . . 108

1.7. Produşi finali ai metabolismului 110
1.7.1. Identificarea bilirubinei în urină 110
1.7.2. Identificarea ureei în urină 112
1.7.3. Determinarea creatininei. Metoda Folin-Wu 112
1.7.4. Determinarea ureei. Metoda Ambard-Hallion 115
1.7.5. Determinarea amoniacului în urină (indicele de formol Ronchèse) 118

Cap. 2. *ENZIME* 121

2.1. Noţiuni generale 121
2.2. Metode de preparare a enzimelor 122
2.2.1. Prepararea ribonucleazei din pancreas. Metoda Kunitz . . 122

BCU IAŞI

2.2.2. Prepararea dezoxiribonucleazei din pancreas. Metoda Baumgarten şi colaboratorii 124
2.2.3. Prepararea polinucleotidfosforilazei din ţesutul hepatic regenerat. Metoda Bogoiavlenskaia, Tongur 125
2.3. Influenţa agenţilor fizico-chimici asupra activităţii enzimelor . . . 127
2.3.1. Influenţa temperaturii 127
2.3.2. Influenţa pH-ului asupra activităţii catalazei vegetale 128
2.3.3. Influenţa ionilor metalelor grele asupra activităţii ureazei şi lipazei 128
2.4. Analiză cantitativă 130
2.4.1. Determinarea activităţii invertazei. Metoda Sumner şi Howell 130
2.4.2. Determinarea activităţii catalazei. Metoda Bach şi Zubkova 131
2.4.3. Rolul catalazei în sînge (Demonstraţie) 133
2.4.4. Determinarea activităţii succindehidrogenazei. Metoda Thunberg 134
2.4.5. Determinarea activităţii dehidrazelor în ţesuturile vii. Metoda Pîlnev 136
2.4.6. Determinarea activităţii peroxidazei vegetale. Metoda cu pirogalol 138
2.4.7. Determinarea activităţii β-amilazei vegetale. Metoda Noelting şi Bernfeld 141
2.4.8. Demonstrarea prezenţei citocromoxidazei şi citocromilor *b*, *c* şi *a* în materialul vegetal. Reacţia „Nadi“ 144
2.4.9. Determinarea activităţii tirozinazei. Metoda Miller şi Dawson 146
2.4.10. Determinarea activităţii ascorbinoxidazei 147
2.4.11. Determinarea activităţii polifenoloxidazei în materialul vegetal Metoda Margna 149
2.4.12. Determinarea activităţii lipazei 151
2.4.13. Determinarea activităţii ribonucleazei după produsele acidosolubile ale hidrolizei acidului ribonucleic 155
2.4.14. Determinarea activităţii fosforilazei. Metoda Cori şi colaboratorii 157
2.4.15. Determinarea activităţii fosfatazei acide şi fosfatazei alcaline. Metoda Huggins şi Talalay 159

Cap. 3. *GLUCIDE* 165
3.1. Noţiuni generale 165
3.2. Proprietăţi fizico-chimice ale glucidelor 167
3.2.1. Reacţii de identificare a monozelor în lichidele şi preparatele biologice 167
3.2.2. Separarea glicogenului hepatic şi proprietăţile lui 180

BCU IAŞI FILIALA MEDICINĂ LIBRARY

3.3. Determinarea glucidelor în materialul biologic 180
3.3.1. Determinarea amidonului. Metoda. Proscuriakov şi Kojevnikova 180
3.3.2. Determinarea glicogenului în ţesuturi. Metoda van der Kleij 181
3.3.3. Determinarea glucozei în sînge. Metoda Hagedorn-Jensen 185
3.3.4. Determinarea glucidelor reducătoare 191
3.3.5. Determinarea pentozelor în ţesuturi 205
3.3.6. Determinarea glucoproteidelor. Metoda Winzler 209
3.3.7. Determinarea produşilor metabolismului intermediar 213

Cap. 4. *LIPIDE* 223
4.1. Noţiuni generale 223
4.2. Analiza cantitativă 225
4.2.1. Determinarea lipidelor în materialul vegetal. Metoda Soxhlet 225
4.2.2. Determinarea lipidelor totale în ţesuturile animale. Metoda Folch şi colaboratorii, modificată de I. F. Dumitru . . 227
4.2.3. Determinarea fosfolipidelor 229
4.2.4. Determinarea cerebrozidelor. Metoda Svennerholm-Taranova 235
4.2.5. Determinarea indicelui de iod. Metoda Hübl 237
4.2.6. Determinarea indicelui de saponificare 240
4.2.7. Determinarea colesterolului total în ţesuturi. Tehnica I. F. Dumitru 242
4.2.8. Determinarea colesterolului liber şi esterificat. Metoda Schoenheimer şi Sperry 244
4.2.9. Determinarea directă a fracţiei lipidelor neutre. Metoda Pokrovski 246
4.2.10. Determinarea acizilor graşi prin cromatografie pe hîrtie. Metoda Fomin şi colaboratorii 248
4.2.11. Determinarea glicerinei 250

Cap. 5. *VITAMINE ŞI HORMONI* 253
5.1. Analiza calitativă 253
5.1.1. Identificarea vitaminei *A*. (Reacţia Carr Price) 253
5.1.2. Identificarea vitaminei B_1 şi a derivatelor ei 253
5.1.3. Identificarea acidului nicotinic şi nicotinamidei. Metoda cromatografiei pe hîrtie 254
5.1.4. Identificarea acidului ascorbic şi dehidroascorbic. Metoda Mapson şi Partridge 255
5.2. Analiza cantitativă 256
5.2.1. Determinarea carotenoizilor. Metoda cromatografiei pe coloană 256
5.2.2. Determinarea cantitativă a acidului ascorbic 260
5.2.3. Determinarea vitaminei *E* 263
5.2.4. Separarea adrenalinei şi noradrenalinei cu ajutorul cromatografiei pe hîrtie. Metoda Shepherd, West, James . . 265

BCU IASI

5.2.5. Determinarea 17-cetosteroizilor totali din urină. Metoda Cohen şi Salter 266

Cap. 6. ELEMENTE MINERALE 271

6.1. Noţiuni generale 271
6.2. Analiza cantitativă 272
6.2.1. Determinarea calciului sanguin. Metoda de Waard . . . 272
6.2.2. Determinarea sodiului în serul sanguin. Metoda Rona şi Kleinmann 273
6.2.3. Determinarea potasiului în serul sanguin. Metoda Kramer şi Tisdall 276
6.2.4. Determinarea clorului urinar. Metoda Mohr 278
6.2.5. Determinarea clorului în serul sanguin. Metoda Keys . . . 279
6.2.6. Determinarea clorurilor în frunzele plantelor 281
6.2.7. Determinarea fosforului anorganic. Metoda Fiske şi Subbaron 283

Anexe 287

Bibliografie 311

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

CAPITOLUL

PROTEIDE

„Generalitățile științifice trebuie să se ridice de la fapte particulare la principii, iar principiile sînt cu atît mai statornice, cu cît se prijină pe amănunte mai profunde, după cum un stîlp este cu atît mai solid, cu cît este înfipt mai adînc în pămînt".

CLAUDE BERNARD

1.1. NOȚIUNI GENERALE

Proteidele reprezintă o clasă eterogenă de substanțe organice alcătuite, în majoritate, din aminoacizi. Ele îndeplinesc în organismele vii un rol plastic deosebit de important, participînd efectiv la arhitectonica structurală a tuturor celulelor vegetale și animale. După natura produselor lor de hidroliză, proteidele se subdivid în două mari grupe: *holoproteide și heteroproteide*[1]. Holoproteidele constituie categoria de proteine simple, prin a căror hidroliză se obțin numai aminoacizi (de exemplu, insulina, ribonucleaza, oxitocina etc.), pe cînd heteroproteidele, scindate pe cale hidrolitică, sînt degradate, cu formare de proteină simplă și o substanță (substanțe) neproteică, denumită în unele cazuri și grupare prostetică[2]. Dintre heteroproteide cele mai importante sînt nucleoproteidele, lipoproteidele, cromoproteidele, fosfoproteidele și glucoproteidele.

Importanța fundamentală a proteidelor în procesele fiziologiei celulare, care condiționează și caracterizează manifestările caracteristice vieții, este astăzi recunoscută nu numai de toți biologii, dar și de alți specialiști.

Proteidele, și în primul rînd acizii nucleici, reprezintă componentele cele mai caracteristice ale materiei vii. Fenomenele *înmulțirii, creșterii* și *dezvoltării* organismelor vii, funcțiile de autoreproducere și autoreînnoire a structurilor celulare și altele sînt strîns legate de rolul primordial pe care proteidele îl îndeplinesc la nivelul diferitelor organe, organite și formații infracelulare și, în particular, în metabolismul celulei.

O particularitate importantă a acestei clase de substanțe o constituie *specificitatea lor biologică*. În prezent, s-a stabilit experimental că fiecare specie animală și vegetală, chiar și virusurile și bacteriile, au proteide specifice. Cercetările biochimice au demonstrat că, la indivizi diferiți care aparțin aceleiași specii, pot fi stabilite variații ale compoziției proteidelor.

---

[1] *holos*=întreg; *heteros*=diferit.
[2] *prostethos*=adăugat.

BCU ... LIBRARY

Spre deosebire de alte componente celulare, care în cursul operațiilor de separare și determinare își modifică într-o măsură mai mare sau mai mică structura lor nativă, proteidele sub influența factorilor fizici și chimici sînt denaturate, ceea ce determină pierderea proprietăților lor biologice. Proteidele native sînt denaturate, în general, sub acțiunea acelorași agenți fizici și chimici care, de regulă, *distrug sau lezează integritatea celulelor vii* (căldura, acizii, bazele, sărurile etc.). Structura moleculelor proteice native este atît de *labilă*, încît ea se modifică chiar și în procesul menajat al extragerii lor din țesuturi. Celelalte componente celulare, de exemplu, glucidele, lipidele, vitaminele etc., nu posedă proprietăți asemănătoare labilității specifice a proteidelor.

Funcțiile pe care reprezentanții acestei clase de substanțe le îndeplinesc în organism sînt multiple. *Proteidele formează materialul inert* al părului, fanerelor etc. și tot din proteide sînt alcătuite și *fibra contractilă musculară*, catalizatorii organismelor vii — *enzimele* —, *pigmenții respiratori ai nevertebratelor și vertebratelor, hormonii unor glande endocrine și exocrine, anticorpii, toxinele* etc.

Proteidele reprezintă cele mai *gigantice edificii moleculare* cunoscute astăzi în știință, complexitatea lor datorîndu-se, pe de o parte, masei lor (macromoleculele proteidelor au o greutate moleculară mare), iar pe de altă parte, unei structuri interne specifice și deosebit de variate.

Numeroase proprietăți biologice ale proteidelor, de exemplu, *comportarea serologică, activitatea enzimatică și hormonală, specificitatea strictă de specie* etc. depind, în mare măsură, de grupările moleculare, care sînt dispuse la suprafața macromoleculei proteice, de configurația spațială a catenelor polipeptidice al căror ansamblu alcătuiește molecula, de arhitectonica generală a proteinei respective. *Cea mai actuală problemă a biochimiei proteidelor* constă în *elucidarea structurii lor interne, a modului în care sînt distribuite grupările funcționale la suprafața macromoleculei proteice.* Se presupune că rezolvarea acestei probleme va permite în mare măsură explicarea proprietăților biologice ale proteidelor în lumina structurii lor moleculare.

Studiul proprietăților fizico-chimice și biologice ale proteidelor are o însemnătate practică și teoretică incontestabilă. Obținerea preparatelor hormonale și enzimatice, pe scară industrială, reclamă stabilirea condițiilor optime de separare și purificare ce permit păstrarea activității produselor separate precum și a condițiilor de conservare a acestora. Pe de altă parte, biochimia acizilor nucleici permite stabilirea exactă a raporturilor filogenetice dintre diferite specii, furnizînd taxonomiei date experimentale prețioase. Determinarea cantitativă a diferitelor componente proteice în lichidele biologice (sînge, urină, lichid cefalorahidian), precum și a produșilor metabolismului proteic intermediar pune la îndemîna cercetătorului un valoros material pentru estimarea stării fiziologice a organismului animal, a compoziției chimice și a valorii nutritive a alimentelor.

1.2. METODE DE SEPARARE A PROTEIDELOR

1.2.1. SEPARAREA CAZEINEI DIN LAPTE. METODA HAMMERSTEN

Cazeina poate fi obținută din lapte prin tratarea acestuia cu acizi (acid acetic, clorhidric, lactic etc.) sau cu amestecuri de acizi (acid clorhidric — acid citric; acid acetic — acid clorhidric etc.). Preparatul de cazeină se prezintă sub forma unei substanțe amorfe, de culoare albă, insolubilă în acizi și apă, însă ușor solubilă în alcalii și în soluțiile sărurilor neutre.

Principiul metodei. Cazeina este prezentă în lapte sub formă de fosfocazeinat de calciu. În mediu acid, sarea de calciu a cazeinei disociază, iar cazeina în stare liberă precipită. Precipitatul este spălat cu apă distilată pentru îndepărtarea excesului de acid, care a fost utilizat ca agent precipitant și a fosforului, prezent în preparat sub formă de fosfați anorganici. În final, preparatul de cazeină este degresat prin tratare cu alcool etilic și eter sulfuric.

Modul de lucru. Într-un balon Erlenmeyer se măsoară cu o pipetă 20—40 ml de lapte proaspăt și o cantitate egală de apă distilată. Cazeina este precipitată prin adăugarea unei soluții de CH_3COOH 10% (aproximativ 2—4 ml) pînă la apariția unui precipitat alb abundent. Conținutul balonului este trecut în tuburi de centrifugă și centrifugat. Supernatantul este îndepărtat prin sifonare și cazeina obținută este spălată de 3—4 ori cu apă distilată (aproximativ 20—30 ml pentru fiecare spălare) pînă la dispariția reacției acide a apelor de spălare (față de hîrtia de turnesol).

Cazeina este tratată în continuare de 2 ori cu cîte 15—20 ml de alcool etilic 96%, filtrată sau centrifugată. Precipitatul obținut este spălat cu 20 ml de eter etilic, și după filtrare este uscat la temperatura camerei. Preparatul de cazeină astfel obținut conține aproximativ 1% fosfor, 15,6% azot și 0,86% sulf. Cazeina obținută cu ajutorul acestei metode este, din punct de vedere biochimic, eterogenă, reprezentînd de fapt un amestec de α, β și γ cazeină.

Metoda descrisă de Hammersten, în care se folosește ca agent precipitant acidul acetic, a fost utilizată prima dată pentru prepararea cazeinei din lapte. De notat că excesul acidului folosit pentru precipitarea cazeinei este nedorit, deoarece la un *p*H inferior punctului izoelectric al cazeinei (mediu acid al cărui *p*H este mai mic de 4,7), cazeina din lapte trece din nou în soluție, datorită unei redistribuiri a sarcinilor electrice.

1.2.2. SEPARAREA PROTEINELOR VEGETALE

În făina cerealelor concentrația proteinelor variază între 10 și 15%. Din această cantitate albuminele reprezintă aproximativ 3—5%, globulinele 6—10%, protaminele 40—50% și glutelinele 30—40%.

Făina de grîu conține aproximativ 5% albumine. Ea este frecvent folosită în laborator pentru obținerea soluțiilor alcaline de proteine vegetale.

Modul de lucru. Într-un mojar se iau 0,5 g făină de grîu și se amestecă energic cu 15 ml soluție de hidroxid de sodiu 0,2%. Amestecul este centrifugat timp de 10 minute la 4 000—5 000 turații/minut și partea alicotă este utilizată pentru efectuarea diferitelor reacții de culoare specifice proteinelor (v. cap. I, D).

1.2.3. SEPARAREA DEZOXIRIBONUCLEOPROTEIDELOR ȘI ACIDULUI DEZOXIRIBONUCLEIC DIN ȚESUTURILE ANIMALE. METODA HAMMERSTEN

Acizii nucleici au fost descoperiți, după cum arată de altfel și denumirea lor, în nucleul celulei. Ei sînt compuși macromoleculari specifici pentru fiecare specie animală și vegetală. Greutatea lor moleculară, în majoritatea cazurilor, variază între 1,5 și 8 milioane și este mult mai mare decît a proteinelor, care este cuprinsă de regulă, între 100 000 și 5 000 000. După compoziția chimică se deosebesc două tipuri de acizi nucleici: acidul ribonucleic *(ARN)* și acidul dezoxiribonucleic *(ADN)*. În compoziția acidului ribonucleic se întîlnesc aproximativ 4 000—5 000 nucleotide, iar în acidul dezoxiribonucleic, numărul acestora variază între 10 000 și 25 000. Structura acizilor nucleici este redată schematic în figura 1, *a*, *b*, *c*.

Acidul dezoxiribonucleic este un constituent celular de o importanță deosebită. Genetica contemporană îi atribuie rolul de depozitar al informației ereditare, iar cercetările biochimice moderne au evidențiat faptul că sinteza proteinelor celulare este controlată și dirijată, prin intermediul acidului ribonucleic, de *ADN* din nucleu.

În țesuturi *ADN* este prezent în cantități relativ mari, formînd aproximativ 4% din greutatea uscată a acestora. Macromoleculele acidului dezoxiribonucleic se găsesc în celule sub formă de dezoxiribonucleoproteide — complexe ale acidului dezoxiribonucleic cu proteinele celulare. Histonele, care participă la formarea acestor complexe, sînt proteine în compoziția cărora se întîlnesc mari cantități de arginină. După proveniența lor, histonele posedă un caracter bazic mai mult sau mai puțin pronunțat. Dintre histone fac parte și nucleohistonele, izolate pentru prima dată din eritrocitele de gîscă și identificate ulterior și în leucocite, în timus, în sperma peștilor etc.

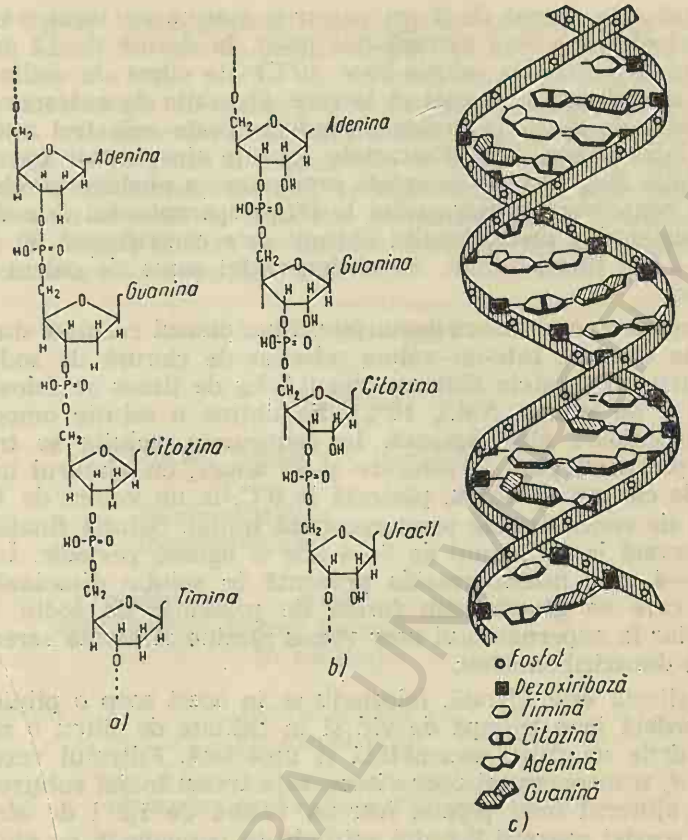


Fig. 1. Schema structurii acizilor nucleici:
a — fragment din moleculele acidului dezoxiribonucleic; *b* — fragment din molecula acidului ribonucleic; *c* — schema structurii bicatenare, dublu-elicoidală, a acidului dezoxiribonucleic, propusă de Watson și Crick.

Principiul metodei: Nucleohistona, care se obține din țesutul animal prin extracții apoase repetate ale acestuia, este precipitată sub forma sării de calciu. Sarea de calciu a nucleohistonei este scindată ulterior în proteină (histonă) și acid nucleic. Acidul dezoxiribonucleic este precipitat din amestec cu alcool etilic.

Reactivi necesari: 1) Citrat de sodiu, soluție 0,01 M; 2) Clorură de calciu, soluție 20%; 3) Clorură de sodiu, soluție 10%; 4) Alcool etilic, soluție 80%; 96%; 5) Eter etilic.

Modul de lucru. Timusul de vițel (0,5 kg), recoltat imediat după sacrificarea animalului, este curățat de țesutul conjunctiv și adipos aderent, iar sîngele este îndepărtat prin spălarea țesutului cu apă rece (0°C). Ulte-

rior, țesutul este trecut de 2 ori printr-o mașină de tocat, răcit în frigider. Nucleohistona este extrasă din țesut, în decurs de 12 ore, la 0°C, cu ajutorul a 5 litri de soluție rece (0°C) de citrat de sodiu, 0,01 *M*. Extractul este decantat și păstrat la rece. Operația de extracție a țesutului se repetă de 2 ori în aceleași condiții. Toate cele trei extracte sînt colectate într-un recipient. Extractele reunite sînt tratate cu clorură de calciu, soluție 20% pînă la completa precipitare a nucleoproteidelor. După 12 ore de conservare a extractului la 0°C, supernatantul este decantat și masa consistentă a precipitatului obținut este centrifugată 20 de minute la 2 500—3 000 turații/minut. Se obține astfel sarea de calciu a nucleoproteidelor.

Separarea acidului dezoxiribonucleic. Precipitatul rezultat după centrifugare este dizolvat într-un volum adecvat de clorură de sodiu, soluție 10% (pentru preparatele obținute din 0,5 kg de timus se folosește aproximativ 1 l de soluție NaCl, 10%). Se obține o soluție omogenă, care prezintă o culoare albă-lăptoasă. În continuare, soluția se tratează cu $NaCl$ (în preparat) pînă la saturare și se aduce, cu ajutorul unei soluții saturate de clorură de sodiu, păstrată la 0°C, la un volum de 10 ori mai mare față de cantitatea de țesut recoltată inițial. Soluția finală rezultată este conservată la 0°C, timp de 3—4 zile și agitată periodic. În decursul acestor 3—4 zile, nucleoproteida prezentă în soluție disociază complet. Proteina, care se găsește sub formă de proteinat de sodiu denaturat, precipită, iar în supernatantul ușor vîscos rămîne dizolvată sarea de sodiu a acidului dezoxiribonucleic.

Partea alicotă este filtrată, folosindu-se în acest scop o pîlnie Büchner racordată la o trompă de vid și în calitate de filtru o masă omogenă de hîrtie de filtru escamotată și umectată. Filtratul rezultat, care este incolor, transparent și ușor vîscos, este trecut în jet subțire, sub presiune, cu ajutorul unei pipete, într-un volum de 1,5 l de alcool etilic, în timpul acestei operații lichidul agitîndu-se permanent, cu ajutorul unei baghete de sticlă. Sarea de sodiu a acidului dezoxiribonucleic se colectează, sub forma unor fire subțiri, în jurul baghetei de sticlă cu care se agită lichidul.

Materialul obținut este separat și ușor presat, cu ajutorul hîrtiei de filtru, dizolvat într-un volum minim de apă distilată, la temperatura de 0°C, reprecipitat prin trecerea soluției într-un volum de 4 ori mai mare de alcool etilic și prin agitarea concomitentă a amestecului cu o baghetă de sticlă. Precipitatul nou-format este spălat de 2 ori cu alcool etilic, soluție 80%, apoi cu alcool etilic 96% și, în final, cu eter etilic. Acidul dezoxiribonucleic rezultat este scos în porții mici din recipientul cu eter, uscat cu ajutorul hîrtiei de filtru, prin tamponare ușoară, și imediat ramificat în firișoare subțiri și expus la temperatura camerei pe hîrtie de filtru. De regulă, preparatele de *ADN* se usucă momentan la temperatura aerului. *Întreaga procedură de separare a acidului dezoxiribonucleic se desfășoară la temperatura de 0°C și la un pH neutru*, pentru a se evita hidroliza parțială a macromoleculei de *ADN*.

Dintr-un kg de timus proaspăt se obţin 9—10 g de acid dezoxiribonucleic, sub formă de sare de sodiu. Preparatul de *ADN* astfel obţinut se prezintă sub forma unui produs cu un grad mare de polimerizare şi cu o greutate moleculară de circa $1 \cdot 10^6$. Verificarea purităţii preparatului se efectuează cu ajutorul reacţiei biuretului. Reacţia biuretului negativă indică absenţa în preparat a urmelor de proteină. Acidul dezoxiribonucleic, obţinut după această tehnică, se dizolvă uşor în apă, rezultînd soluţii vîscoase. În condiţii de laborator preparatul poate fi conservat timp îndelungat (2—3 ani) fără să se altereze. Schema separării acidului dezoxiribonucleic este redată în figura 2.

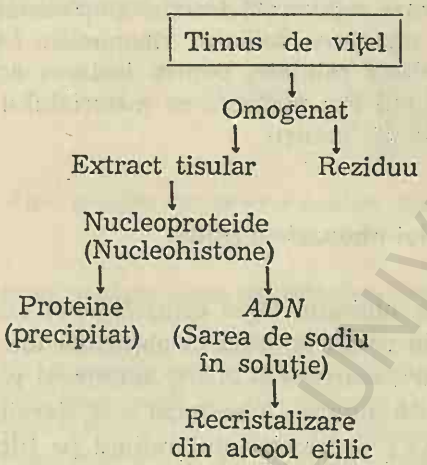


Fig. 2. Schema separării acidului dezoxiribonucleic după metoda Hammersten.

În tehnica originală descrisă de Hammersten, pentru extracţia ţesutului se foloseşte apa distilată. Modificarea introdusă ulterior, care constă în utilizarea unei soluţii de citrat de sodiu 0,01 *M*, prezintă unele avantaje: procesul de depolimerizare este practic anihilat, iar randamentul metodei sporit. Această metodă este curent folosită în laboratorul de biochimie pentru obţinerea preparatelor de *ADN* cu un grad de polimerizare satisfăcător.

1.2.4. SEPARAREA ACIZILOR NUCLEICI (ARN ŞI ADN) DIN ŢESUTURILE ANIMALE. METODA TSUBOI ŞI STOWELL

Principiul metodei. Constituenţii celulari, după omogenizarea ţesutului, sînt separaţi prin centrifugare în două părţi: fracţia nucleară şi fracţia citoplasmatică. Acizii nucleici sînt extraşi din cele două fracţii cu soluţii de clorură de sodiu de diferite concentraţii.

Reactivi necesari: 1) Clorură de sodiu, soluție 0,85% și 10%; 2) Alcool etilic 96%; 3) Cloroform; 4) Clorură de sodiu, soluție saturată.

Modul de lucru. Țesuturile hepatice sînt recoltate de la cîteva animale de laborator (cobai, șobolani) care au fost ținute la o dietă săracă în glucide, timp de 18 ore, pentru a se evita acumularea unei mari cantități de glicogen în celulele hepatice. Imediat sînt omogenizate în prezența unui volum de 4 ori mai mare de soluție de clorură de sodiu 0,85%, răcită la 0°C. Omogenatul rezultat este centrifugat la 1 500×g, timp de 4 minute. Supernatantul, care reprezintă fracția citoplasmatică, este utilizat în continuare pentru separarea acidului ribonucleic (*ARN*), iar precipitatul, care conține nucleele celulare, pentru izolarea acidului dezoxiribonucleic (*ADN*). În ultimul caz prelucrarea materialului se efectuează la temperatura de 0°C și la *p*H neutru.

1.2.4.1. Separarea acidului ribonucleic (ARN)

La fracția citoplasmatică, obținută după centrifugarea omogenatului, se adaugă clorură de sodiu, în preparat, pînă la obținerea unei soluții finale de aproximativ 10%. Pentru extragerea *ARN*, amestecul rezultat este încălzit la fierbere, timp de 10 minute. Amestecul încă fierbinte se filtrează printr-o o pîlnie Büchner și precipitatul reținut pe filtru se spală cu cantități mici de soluție de clorură de sodiu 10%. Filtratul de culoare gălbuie este colectat în pîlnia Büchner și se trece, în jet subțire, într-un volum de 2 ori mai mare de alcool etiiic 96%, rece. Acidul ribonucleic precipită imediat sub forma unei mase albe, consistente.

Precipitatul acidului ribonucleic este separat din soluția alcoolică prin centrifugare și spălat de 2 ori cu cantități suficient de mari de alcool etilic, 96%. Imediat după aceea acidul ribonucleic este dizolvat într-un volum minim de apă distilată. Rezultă o soluție incoloră la care se adaugă un volum egal de cloroform. Amestecul se agită cîteva minute. Îndepărtarea urmelor de proteine se face prin centrifugarea amestecului. În final, soluția de acid ribonucleic este introdusă într-un dializor și dializată timp de 72 de ore, la temperatura de 2—5°C. În acest scop se utilizează apă distilată, care se schimbă la intervale mici de timp.

Din întreaga cantitate de *ARN* prezentă în țesut se obține sub formă de sare a *ARN* numai aproximativ 40%. În figura 3 se redă schematic separarea acizilor ribonucleic și dezoxiribonucleic după Tsuboi și Stowell.

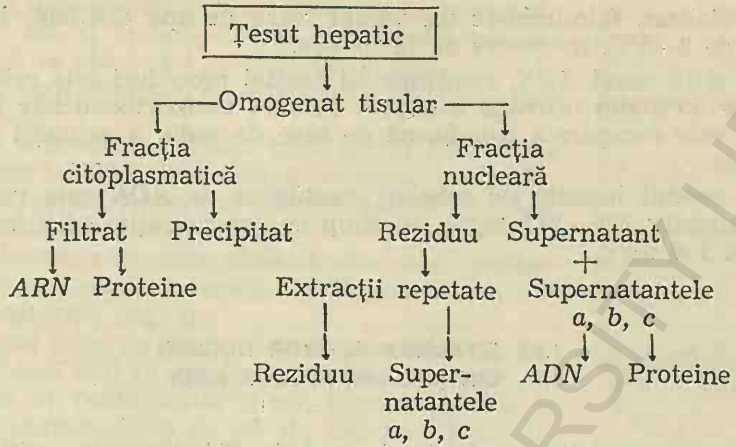


Fig. 3. Separarea *ARN* și *ADN* din țesutul hepatic după Tsuboi și Stowell.

1.2.4.2. Separarea acidului dezoxiribonucleic (ADN)

Fracția nucleară a omogenatului tisular este tratată cu soluție saturată de clorură de sodiu. Se adaugă soluție saturată de NaCl pînă cînd volumul final al amestecului este egal cu volumul inițial al omogenatului obținut din țesutul hepatic. Amestecul se agită cîteva minute cu ajutorul unui agitator mecanic și pentru separarea acidului dezoxiribonucleic este centrifugat la 8 000 turații/minut într-o centrifugă cu răcire (la 0°C); supernatantul care conține *ADN* este colectat.

Precipitatul rezultat după centrifugare este din nou extras de cîteva ori (2—3) cu soluție saturată de NaCl și de fiecare dată recentrifugat. Supernatantele parțiale sînt reunite și introduse, în jet subțire, sub o ușoară presiune, într-un volum de 2 ori mai mare de alcool etilic. *ADN* se înfășoară pe bagheta cu care se agită amestecul în timpul trecerii extractelor în alcoolul etilic.

Pentru îndepărtarea urmelor de proteine din preparatul de *ADN* obținut, ultimul se dizolvă într-un volum minim de soluție saturată de NaCl și precipitatul proteic, care se formează spontan, este separat prin filtrare, folosindu-se în acest scop o pîlnie Büchner. Lichidul vîscos, obținut după filtrarea amestecului, este trecut în 2 volume de alcool etilic 96% și *ADN*, care precipită sub forma unor filamente, este colectat prin agitarea lichidului cu o baghetă de sticlă. Acidul dezoxiribonucleic obținut este dizolvat din nou într-un volum minim de apă distilată, la care se adaugă apoi un volum egal de cloroform. Amestecul este agitat energic pentru extragerea eventualelor proteine prezente în preparat sub formă de urme și care sînt separate ulterior prin centrifugare. Centrifugatul

BCU CLUJ UNIVERSITY LIBRARY

este dializat, folosindu-se un volum mare de apă distilată, la temperatura de 2—5°C, în decurs de 72 de ore.

Ca şi în cazul *ARN*, randamentul acestei proceduri este relativ scăzut, numai 45% din întreaga cantitate de acid dezoxiribonucleic prezentă în ţesut este recuperată sub formă de sare de sodiu a acidului dezoxiribonucleic.

În ţesutul hepatic de şobolan, cantitatea de *ADN* este relativ mare, aproximativ 266—273 mg%, în timp ce concentraţia *ARN* variază între 140 şi 150 mg%.

1.2.5. SEPARAREA ACIZILOR NUCLEICI DIN ŢESUTURI. METODA KIRBY

Extragerea acizilor nucleici prin metoda Kirby, care utilizează fenolul ca agent de extracţie a *ADN* şi *ARN*, prezintă numeroase avantaje faţă de metodele descrise anterior. Metoda cu fenol permite, într-un interval de timp relativ scurt, separarea unor preparate macromoleculare ale acizilor nucleici cu un grad de polimerizare mare. Folosirea fenolului este avantajoasă, deoarece, pe de o parte, fenolul provoacă deproteinizarea aproximativ momentană a unei părţi importante din nucleoproteidele tisulare concomitent cu dizolvarea unei cantităţi însemnate a proteinelor structurale prezente în ţesut. Pe de altă parte, fenolul inactivează în acelaşi timp şi enzimele (nucleazele), care în procesul separării pot cataliza o depolimerizare parţială sau totală a acizilor nucleici.

Principiul metodei: Omogenatul tisular este tratat cu soluţie apoasă de fenol şi în funcţie de *p*H-ul soluţiei, în stratul fenolic apos este extrasă fracţia corespunzătoare a acizilor nucleici, care este separată prin precipitarea ulterioară cu alcool etilic.

Reactivi necesari: 1) Acetat de potasiu, soluţie 20%; 2) Alcool etilic 96%; 3) Fosfat acid de potasiu, soluţie 1,5 *M*; 4) Acid fosforic, soluţie 33,3%; 5) 2-etoxietanol, proaspăt distilat; 6) Toluen; 7) Pentoxid de fosfor, preparat; 8) *p*-aminosalicilat de sodiu, soluţie 6%; 9) Fenol, soluţie apoasă 90%; 10) Ribonuclează; 11) Acetat de sodiu, soluţie 1%.

1.2.5.1. Separarea acidului ribonucleic (ARN)

100 g de ficat de şobolan, congelate cu ajutorul zăpezii carbonice, sînt omogenizate, în prezenţa a două volume de apă distilată, timp de 4 minute. Omogenatul este filtrat. Volumul filtratului rezultat se măsoară şi se adaugă un volum de apă distilată de 5 ori mai mare. Amestecul se agită energic, cu ajutorul unui agitator magnetic, timp de 1 oră, în prezenţa unui volum egal de fenol 90%, adăugat rapid la amestec.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Amestecul este centrifugat la 2 000 turații/minut, în decurs de 1 oră și la temperatura de 0°C. În tuburile de centrifugă se observă 4 straturi distincte:

— *stratul apos superior*, care conține acid *ribonucleic și polizaharide;*

— *stratul intermediar*, situat între limita dintre faza apoasă și faza fenolică, care conține *proteine insolubile;*

— *stratul fenolic*, în care se găsește o mare cantitate de *proteine dizolvate în fenol;*

— *precipitatul*, care este alcătuit din două componente — dintr-o *nucleoproteidă* (*ADN*-proteidă) și din *proteine denaturate* (fig. 4).

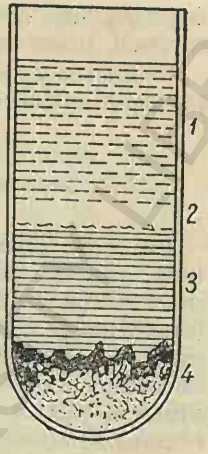


Fig. 4. Separarea acidului ribonucleic prin centrifugarea omogenatului tisular:
1 — strat apos; *2* — strat intermediar; *3* — strat fenolic; *4* — precipitat.

Stratul apos superior este colectat prin sifonare, iar cele trei straturi sînt în continuare spălate de 3 ori cu apă distilată și centrifugate după fiecare spălare la 2 600 turații/minut, timp de 45 de minute. Straturile apoase rezultate după fiecare spălare cu apă distilată sînt colectate prin sifonare. Toate extractele apoase sînt reunite și tratate cu o soluție apoasă de acetat de potasiu 10%, în așa fel încît concentrația finală a acestuia în amestec să fie de 2%.

Acidul ribonucleic prezent în extractele apoase colectate este precipitat prin adăugarea unui volum de alcool etilic de 2 ori mai mare. Precipitatul format este separat prin centrifugarea amestecului timp de 20 de minute la 2 000 turații/minut. *ARN* este spălat cu un amestec de alcool etilic-apă, în proporție de 3 : 1. După o nouă precipitare cu alcool etilic absolut, preparatul rezultat se dizolvă într-o cantitate mică de apă distilată. Îndepărtarea proteinelor și a urmelor de acid dezoxiribonucleic din soluția apoasă și transparentă a acidului ribonucleic se realizează prin tratarea acesteia cu un volum egal de K_2HPO_4 soluție de 2,5 *M*, adăugîndu-se 0,05 volume (din volumul amestecului) de H_3PO_4, soluție 33,3%. La acest amestec se mai adaugă un volum egal de 2-metoxietanol, proaspăt distilat. Impuritățile de natură proteică care precipită, după decantarea lichidului, sînt spălate cu o soluție care constă din reactivii: 2-metoxietanol, apă, K_2HPO_4 soluție 2,5 *M* și H_3PO_4, soluție 33,3%, amestecați în următorul raport de volume: 1 : 1 : 1 : 0,05.

Lichidul colectat prin decantările repetate conține acid ribonucleic în cantități mari, precum și urme de impurități insolubile. Acesta este centrifugat, timp de 1 oră, la 10 000×g, iar la supernatantul, care este transparent, se adaugă 2—3 picături de toluen și este dializat, utilizîndu-se un volum de 4 ori mai mare de apă distilată. După dializă conținutul sacului celofanic este trecut într-un recipient și tratat cu soluție de acetat de potasiu 20% pînă la obținerea unei concentrații finale a acestuia de 2%. *ARN* precipită prin adăugarea la soluție a unui volum de 2 ori mai mare de alcool etilic. Precipitatul rezultat este separat prin

centrifugare, spălat de 2—3 ori cu amestec de alcool etilic-apă (3 : 1) și, în final, uscat în vacuum pe P_2O_5.

Utilizarea corectă a metodei permite izolarea din 100 g de țesut hepatic proaspăt a 450—600 mg de acid ribonucleic.

1.2.5.2. Separarea acidului dezoxiribonucleic (ADN)

100 g de țesut hepatic, congelat, imediat după recoltarea lui, cu ajutorul zăpezii carbonice, sînt omogenizate timp de 1 minut în prezența unui volum de 2 ori mai mare de soluție de p-aminosalicilat de sodiu 6% (aproximativ 600 ml). După omogenizarea țesutului și estimarea volumetrică a omogenatului obținut se adaugă o cantitate de 6 ori mai mare de soluție de p-aminosalicilat de sodiu. Amestecul se filtrează la vid cu ajutorul pîlniei Büchner racordate la trompa de vid; la filtratul astfel obținut se adaugă un volum egal (600 ml) de soluție apoasă de fenol 90%. Amestecul se agită energic, timp de 1 oră, la 0°C, cu ajutorul unui agitator magnetic, după care este centrifugat, timp de 20 de minute, la 10 000 turații/minut într-o centrifugă cu răcire. *Lichidul transparent, sau ușor colorat în galben, care se găsește situat în partea superioară a centrifugatului (stratul apos), este colectat prin sifonare. Stratul fenolic* și *materialul celular insolubil* (resturi de membrane celulare și nucleare) sînt spălate încă o dată cu mici volume de soluție de p-aminosalicilat de sodiu 6%, centrifugat în condițiile menționate mai sus, iar stratul apos rezultat este separat prin centrifugare și colectat prin sifonare.

Straturile apoase, colectate prin sifonarea centrifugatelor, sînt reunite (se obțin aproximativ 400 ml), și în scopul precipitării acidului dezoxiribonucleic sînt tratate cu un volum egal de 2-etoxietanol. După precipitare, acidul dezoxiribonucleic este scos din soluție cu ajutorul unei baghete de sticlă și introdus imediat în circa 100 ml apă distilată, ceea ce corespunde unui volum de H_2O distilată egal cu 0,25% din volumul straturilor apoase reunite. După 30 de minute de agitare, care se realizează cu ajutorul agitatorului magnetic, la soluția apoasă a acidului dezoxiribonucleic se adaugă p-aminosalicilat de sodiu, în preparat, pînă la obținerea unei concentrații finale a p-aminosalicilatului în soluție de 6%. Acidul dezoxiribonucleic este precipitat din nou din această soluție cu ajutorul 2-etoxietanolului, în care scop se adaugă un volum egal cu volumul soluției de *ADN*. În amestecul soluției apoase de *ADN*-etoxietanol, al cărui volum este de aproximativ 100 ml, acidul ribonucleic nu este precipitat, ci rămîne în soluție.

Precipitatul care reprezintă preparatul de *ADN* se redizolvă în apă, utilizîndu-se același volum ca mai sus și la soluție se adaugă acetat de sodiu pînă la o concentrație finală a acestuia în soluție de 4%. *ADN* este din nou reprecipitat prin adăugarea unui volum egal (100 ml) de 2-etoxietanol. Precipitatul rezultat este separat și dizolvat într-un volum de apă distilată de 2 ori mai mic decît cel folosit anterior (aproximativ 50 ml), la care se adaugă pentru fiecare ml de apă utilizat cîte 2 g de acetat de

sodiu și 1,5 mg preparat de ribonuclează. Amestecul se lasă în repaus la 2°C, timp de 16 ore. După această perioadă de timp, acidul dezoxiribonucleic este precipitat, în care scop se folosesc 50 ml de 2-etoxietanol și, cît mai repede posibil, este colectat din lichid și dizolvat în 33 ml apă distilată.

După completa dizolvare în apă a acidului dezoxiribonucleic, care durează aproximativ 15—30 de minute, la soluția apoasă a acestuia se adaugă un volum egal de soluție de fosfat de potasiu (33 ml K_2HPO_4, 2,5 *M* și 1,65 ml H_3PO_4, 33,3%) și un volum egal de 2-etoxietanol (33 ml). Amestecul este agitat energic și ulterior lăsat în repaus pentru delimitarea netă a straturilor. *Stratul superior este separat prin sifonare și centrifugat timp de 1 oră la 10 000×g.* La soluția transparentă, care este separată atent de sedimentul rezultat, se adaugă 2—3 picături de toluen și amestecul este dializat de două ori, utilizîndu-se apă distilată (un volum care depășește de 25 ori greutatea țesutului luat inițial pentru extracția *ADN*) și ulterior dializat de 2 ori, folosindu-se un volum egal (2 l) de acetat de sodiu soluție 1%.

După dializă, materialul este din nou centrifugat și la supernatant se adaugă acetat de sodiu, în preparat, pînă la o concentrație finală a acestuia de 4%. *ADN* este reprecipitat prin adăugarea unui volum egal de 2-etoxietanol. Precipitatul fibros care se formează este spălat de 2 ori cu amestec alcool etilic-apă distilată 3 : 1. În final, *ADN* se spală cu alcool etilic 96% și se usucă în exicator pe clorură de calciu.

Preparatul de *ADN* realizat după această metodă are o culoare albă și o soluție de 15% posedă un maximum de absorbție la $\lambda = 258$ mμ.

În cazul cînd metoda este aplicată corect din 100 g de țesut hepatic proaspăt recoltat se obțin aproximativ *200 mg de sare de sodiu a acidului dezoxiribonucleic.*

1.2.6. SEPARAREA ACIDULUI RIBONUCLEIC. METODA CHANTRENNE

Principiul metodei. Acidul ribonucleic din drojdia de bere este separat, după hidroliza alcalină prealabilă a nucleoproteidelor la 0°C, prin preciptare cu alcool în mediu ușor acid.

Reactivi necesari: 1) Hidroxid de sodiu, soluție (se dizolvă 100 g NaOH în 300 ml de apă distilată și soluția se răcește la 0°C); 2) Acid acetic, soluție 30—40%; 3) Alcool etilic absolut; 4) Acid clorhidric concentrat; 5) Eter sulfuric; 6) Amoniac, soluție concentrată.

Modul de lucru. Într-un litru de apă distilată, răcită la 0°C, se introduc 300 g de drojdie de bere și amestecul se agită energic timp de 5—10 minute. La suspensia rezultată se adaugă, picătură cu picătură, agitîndu-se continuu, 300 ml de apă distilată în care au fost dizolvate 100 g de NaOH (soluția trebuie să fie răcită la 0°C înainte de folosire). În timpul adău-

gării soluției de hidroxid de sodiu se va urmări temperatura amestecului, care nu trebuie să depășească 0—1°. Eventual, adăugarea soluției de NaOH se va face după introducerea recipientului, care conține amestecul, într-o baie de gheață. Concentrația hidroxidului de sodiu în amestecul final nu trebuie să depășească 3,5%. După adăugarea întregii cantități de soluție de NaOH, volumul amestecului se aduce la 2 l cu apă distilată și se lasă în repaus la 0°C, timp de 1—1½ oră.

Efectuarea operațiilor la 0°C este condiționată de faptul că, la temperatura laboratorului, utilizarea hidroxidului de sodiu provoacă ridicarea temperaturii amestecului, ceea ce determină o hidroliză parțială a acidului ribonucleic.

După 1—1½ oră de la adăugarea soluției de NaOH, se măsoară cu o pipetă soluție de acid acetic 30—40%, pînă la obținerea unei reacții ușor acide a amestecului față de hîrtia de turnesol (*p*H 6,5—6,8). Precipitatul care apare (proteinele) este separat prin filtrare. La filtratul obținut se adaugă pînă la 4—5% din volumul lui alcool etilic absolut, ceea ce înseamnă o concentrație finală a alcoolului de 4%. După 20—30 de minute apare un precipitat care se separă prin filtrare sau centrifugare. La filtratul rezultat se adaugă un volum egal de alcool etilic. Agitîndu-se energic, se adaugă cu pipeta acid clorhidric concentrat pînă la reacție ușor acidă a întregului filtrat. În aceste condiții, acidul ribonucleic precipită abundent sub forma unor floculi de culoare albă.

După precipitarea completă a acidului ribonucleic, partea alicotă a amestecului este decantată, și precipitatul este spălat de 2—3 ori cu alcool etilic absolut și ulterior degresat și uscat prin spălare cu eter etilic pur.

Purificarea preparatului de eventualele impurități este realizată după dizolvarea acestuia în apă distilată în prezență de amoniac. La soluția acidului ribonucleic se adaugă acid acetic. În cazul apariției unui precipitat, soluția se filtrează, iar acidul ribonucleic este spălat în final cu eter etilic și uscat în exicator, sub vacuum. Preparatul de *ARN*, obținut după această metodă, nu conține proteine, reacția biuretului fiind negativă.

Observații. Procedeul Chantrenne necesită importante cantități de reactivi, în special alcool etilic absolut, precum și un timp îndelungat. Randamentul metodei este satisfăcător, obținîndu-se aproximativ 4 g de acid ribonucleic din 300 g de drojdie de bere, însă, depinde în mare măsură și de calitatea preparatelor de drojdie de bere.

Preparatul acidului ribonucleic obținut din drojdie de bere este insolubil în apă. De aceea pentru prepararea soluțiilor de *ARN* se procedează mai întîi la obținerea sării de sodiu a acidului. În acest scop, o cantitate bine definită de acid ribonucleic se amestecă cu un volum de 50 ori mai mare de apă distilată rece și amestecul se aduce la *p*H 6,0 cu ajutorul unei soluții de hidroxid de sodiu 2%. Dacă soluția este puternic opalescentă se filtrează. Filtratul este măsurat, răcit în frigider la 0°C și, ulterior, tratat cu un volum de acetonă de 3 ori mai mare. Sarea de sodiu

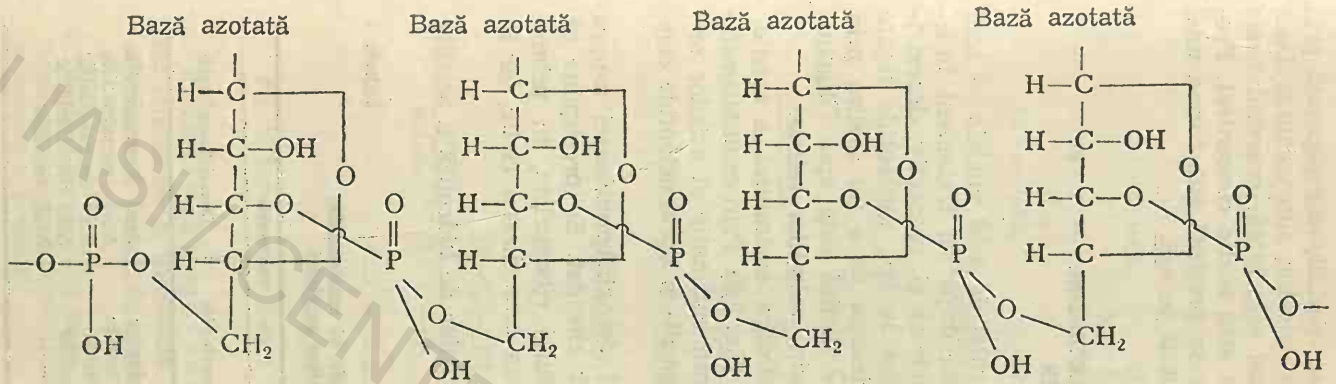


Fig. 5. Oligonucleotida obținută după hidroliza enzimatică a acidului ribonucleic.

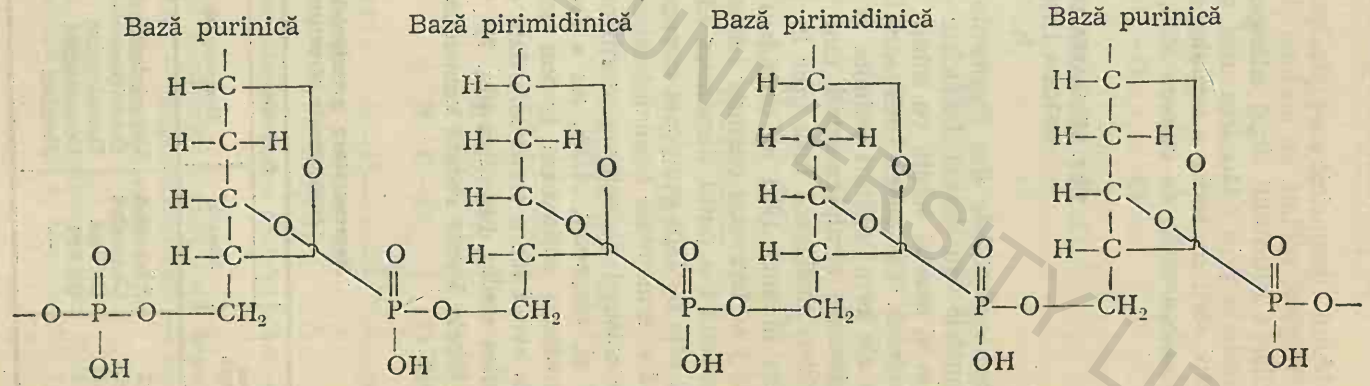


Fig. 6. Oligonucleotida obținută după hidroliza enzimatică a acidului dezoxiribonucleic.

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

a acidului ribonucleic care precipită în aceste condiții, este separată prin centrifugare, spălată cu acetonă și uscată în exicator, sub vacuum. Dacă flocularea filtratului după adăugarea acetonei este lentă, procesul poate fi accelerat prin adăugarea unei picături de acid acetic concentrat. Preparatul sării de sodiu a acidului ribonucleic se prezintă sub forma unei substanțe amorfe, de culoare albă, ușor solubilă în apă.

1.2.7. SEPARAREA OLIGONUCLEOTIDELOR. METODA LITTLE ȘI BUTLER

Oligonucleotidele sînt fragmente ale moleculei de acid nucleic — acid ribonucleic sau dezoxiribonucleic — rezultate după un tratament îndelungat al acestei soluții cu soluții de ribonuclează și, respectiv, dezoxiribonuclează. Ele conțin trei-patru, uneori pînă la opt, nucleotide legate între ele prin legături chimice și au proprietatea de a nu dializa prin membranele semipermeabile cînd mediul de dializă este apa. Oligonucleotidele dializează însă ușor în cazul folosirii soluțiilor saline.

Pînă în anul 1951 se considera că la hidroliza enzimatică a acizilor nucleici se formează exclusiv tetranucleotide (fig. 5,6). Prin cromatografie pe coloană s-a putut demonstra că hidrolizatul enzimatic al acizilor nucleici este de fapt mult mai eterogen, pe lîngă di- și tetranucleotide conținînd și numeroase hexanucleotide.

Mecanismul de acțiune al ribonucleazei și dezoxiribonucleazei asupra *ARN* și, respectiv, *ADN*, nu a fost complet elucidat. Se presupune că ribonucleaza acționează treptat asupra acidului ribonucleic, în primul stadiu avînd loc o transfosforilare cu formarea unui diester ciclic, iar în al doilea stadiu, hidroliza (fig. 7).

În tabela 1 este redată nomenclatura produșilor de hidroliză a acizilor nucleici.

Tabela 1

Nomenclatura principalelor nucleotide și nucleozide, componente structurale ale acizilor nucleici

Baza azotată	Nucleozide		Nucleotide	
	Ribozide	Dezoxiribozide	Ribonucleotide	Dezoxiribonucleotide
Adenină	Adenozină	Dezoxiadenozină	Acid adenilic	Acid dezoxiadenilic
Guanină	Guanozină	Dezoxiguanozină	Acid guanilic	Acid dezoxiguanilic
Citozină	Citidină	Dezoxicitidină	Acid citidilic	Acid dezoxicitidilic
Uracil	Uridină	Dezoxiuridină	Acid uridilic	Acid dezoxiuridilic
Timină	—	Timidină	—	Acid timidilic

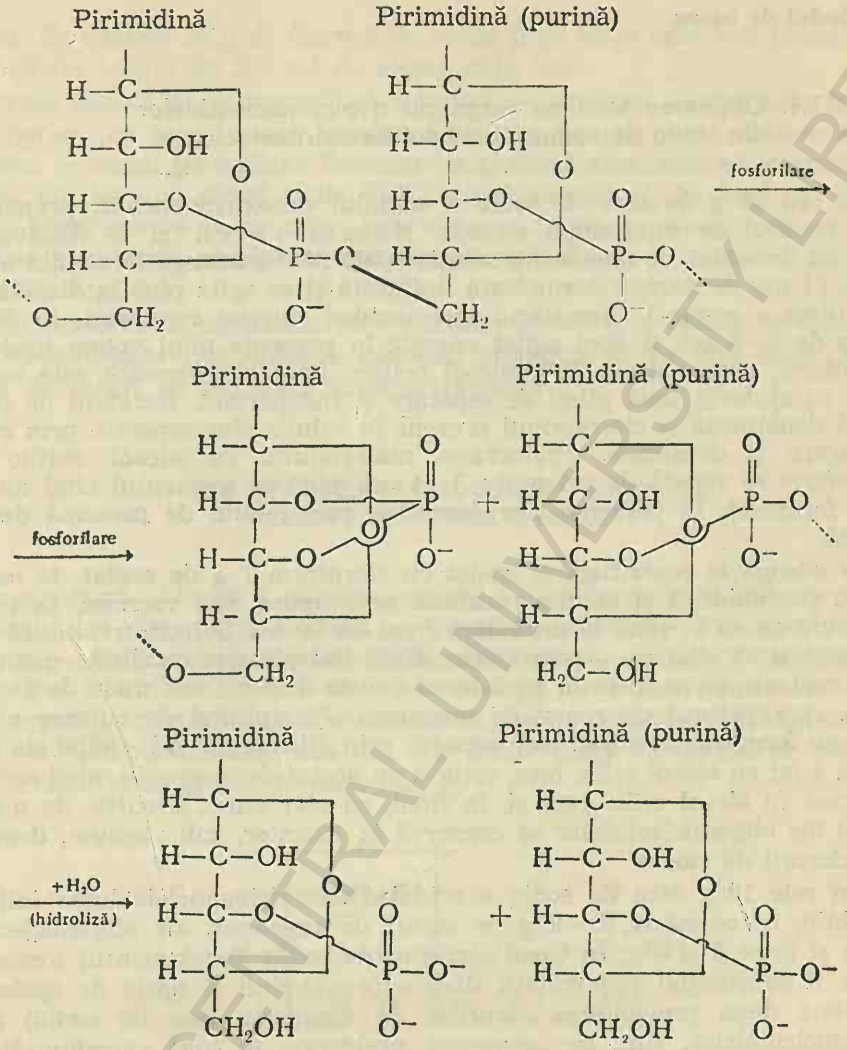


Fig. 7. Schema ipotetică a acțiunii ribonucleazei asupra acidului ribonucleic.

Principiul metodei. Acidul dezoxiribonucleic este depolimerizat enzimatic și produsele de degradare — oligonucleotidele — sînt precipitate sub formă de săruri de magneziu sau săruri de sodiu.

Reactivi necesari: 1) Sarea de sodiu a acidului dezoxiribonucleic; 2) Sulfat de magneziu, soluție 0,003 *M*; 3) Dezoxiribonuclează, preparat; 4) Alcool octilic; 5) Acetat de magneziu, preparat.

BCU CLUJ / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Modul de lucru

1.2.7.1. Obținerea sării de magneziu a oligonucleotidelor din sarea de sodiu a acidului dezoxiribonucleic

Se iau 10 g de sare de sodiu a acidului dezoxiribonucleic, preparată din timusul de vițel după metoda Hammersten și se dizolvă în 500 ml de sulfat de magneziu, soluție 0,003 *M*. Se adaugă la soluția obținută 61 mg de dezoxiribonuclează liofilizată și se agită pînă la dizolvarea completă a enzimei. Amestecul este incubat într-un termostat, la 30°C, timp de 6—8 ore și apoi agitat energic în prezența unui volum egal de cloroform, care conține 10% alcool octilic. *Faza cloroformică* este separată cu ajutorul unei pîlnii de separare și îndepărtată. *Reziduul* de proteină denaturată și cloroformul prezent în soluție sînt separate prin centrifugare și decantate. Prelucrarea materialului cu alcool octilic în cloroform se repetă de cel puțin 3—4 ori, pînă în momentul cînd nu se mai formează, în prezența cloroformului, precipitatul de proteină denaturată.

Se adaugă la centrifugatul spălat cu cloroform 7 g de acetat de magneziu (tetrahidrat) și soluția rezultată se evaporă, sub vacuum, la temperatura de 40°C, pînă la un volum final de 50 ml. Soluția trebuie să fie incoloră și să aibă un aspect vîscos. Dacă îndeplinește condițiile menționate mai sus, ea se trece în jet într-un volum de 3 ori mai mare de alcool etilic rece, saturat cu acetat de magneziu. Precipitatul de culoare albă, care se formează imediat, este separat prin filtrare la vid, spălat de cel puțin 4 ori cu alcool etilic rece, saturat cu acetat de magneziu, apoi spălat din nou cu alcool etilic rece și, în final, cu eter etilic. Sărurile de magneziu ale oligonucleotidelor se conservă în exicator, sub vacuum, deasupra clorurii de calciu.

Din cele 10 g sare de sodiu a acidului dezoxiribonucleic luate inițial se obțin, aproximativ, 8—9 g de săruri de magneziu ale oligonucleotidelor și între 6 și 8 g, în cazul sărurilor de sodiu. Randamentul metodei poate fi substanțial îmbunătățit dacă supernatantul și apele de spălare, rezultate după precipitarea sărurilor de magneziu (sau de sodiu) ale oligonucleotidelor, sînt, de asemenea, prelucrate în mod corespunzător.

1.2.7.2. Obținerea sării de sodiu a oligonucleotidelor din sarea de sodiu a acidului dezoxiribonucleic

Se iau 9,3 g de sare de sodiu a acidului dezoxiribonucleic, se dizolvă în 500 ml de acetat de magneziu, soluție 0,003 *M* și hidroliza se realizează în prezența a 61 mg dezoxiribonuclează liofilizată. După deproteinizare soluția este concentrată sub vacuum pînă la un volum final de

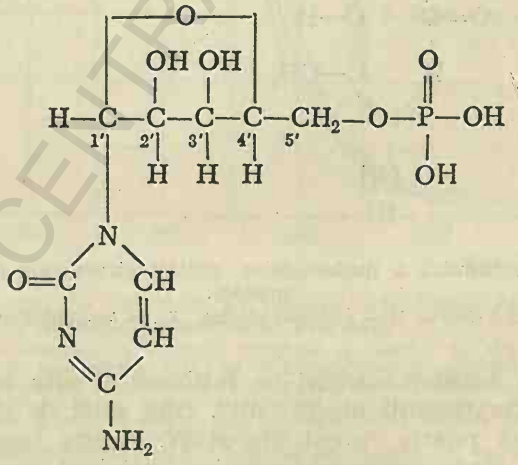
50 ml. Se adaugă 10 g de clorură de sodiu și se trece apoi sub formă de jet într-un volum de 200 ml de alcool etilic rece.

Partea alicotă se decantează și reziduul se spală cu alcool etilic 95% și, ulterior, cu alcool etilic absolut. Reziduul obținut după spălare este mojarat și trecut pe o pîlnie Büchner cu ajutorul alcoolului etilic absolut, spălat din nou cu alcool etilic 95%, alcool absolut și, în final, cu eter etilic. După uscare în exicator, sub vacuum, deasupra clorurii de calciu, substanța obținută cîntărește aproximativ 5,6—5,8 g și conține 7,22% P și 0,25% Mg.

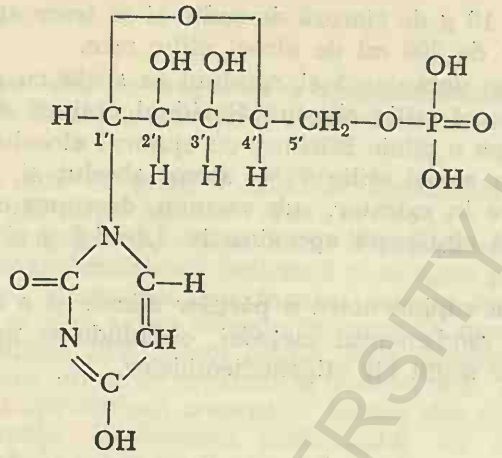
Prin prelucrarea suplimentară a părților alicote și a apelor de spălare se îmbunătățește randamentul metodei, obținîndu-se în plus între 2 și 3,2 g de săruri de sodiu ale oligonucleotidelor.

1.2.8. SEPARAREA NUCLEOTIDELOR PIRIMIDINICE. METODA LORING, ROLL ȘI PIERCE

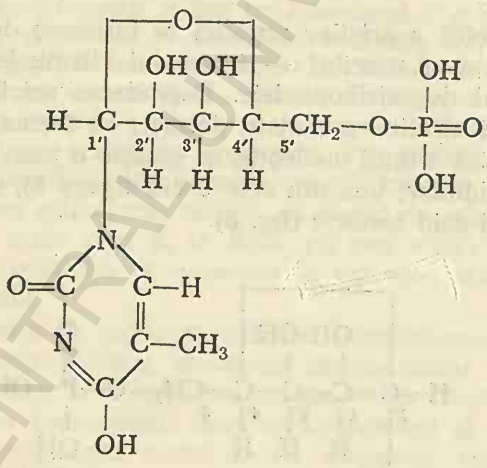
În structura chimică a acizilor nucleici se întîlnesc două baze azotate pirimidinice: citozina și uracilul — în acidul ribonucleic și citozina și timina — în acidul dezoxiribonucleic. Degradarea acizilor nucleici prin procedeul hidrolizei alcaline menajate decurge cu formare de nucleotide. În compoziția chimică a unui nucleotid se găsește o bază azotată (în cazul nucleotidelor pirimidinice, una din cele 3 din figura 8), un glucid (riboza sau dezoxiriboza) și acid fosforic (fig. 8).



I.



II.



III.

Fig. 8. Compoziția chimică a nucleotidelor, unități structurale de bază ale acizilor nucleici:
I — citidina-5'-fosfat; II — uridina-5'-fosfat; III — timidina-5'-fosfat.

În compoziția acizilor nucleici se întîlnesc și alte baze, denumite și „atipice" sau „componenți neobișnuiți", cum este, de exemplu, 5-metilcitozina, separată relativ recent din *ARN*. Aceste baze după hidroliza *ARN* formează nucleotidele pirimidinice „atipice" corespunzătoare lor. Nucleotidele sînt frecvent denumite și în funcție de prezența în molecula

BCU ȘI CENTRALĂ UNIVERSITY LIBRARY

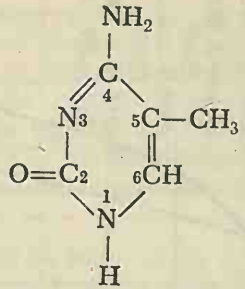


Fig. 9. Structura 5-metilcitozinei.

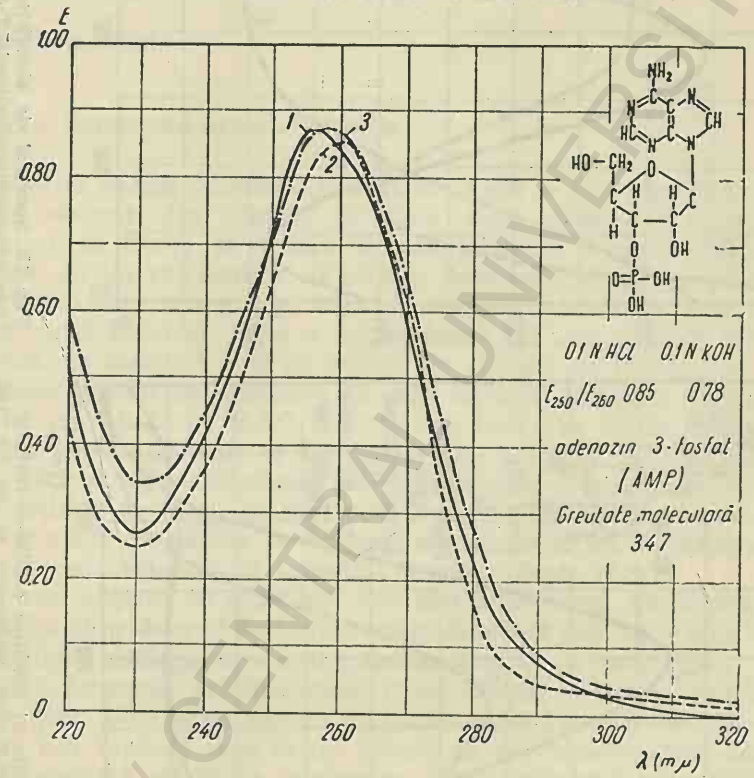


Fig. 10. Spectrul de absorbție al acidului adenozin-3′-fosforic (6-amino-purin-ribozid-3′-fosfat):

1 — Curba de absorbție a acidului preparat în soluție de HCl 0,1 *N*. Absorbția a fost înregistrată față de o soluție martor de HCl 0,1 *N*; *2* — curba de absorbție a probei utilizate anterior alcalinizată cu soluție de NaOH 4 *N*; *3* — curba de absorbție a probei folosite anterior, reacidulată prin tratarea ei cu 3 ml soluție HCl care conține 0,1 ml apă de brom, soluție saturată.

În dreapta graficului este redată formula structurală a compusului, greutatea moleculară și extincția maximă înregistrată în mediu acid și mediu alcalin, la lungimea de undă de 250—260 mμ (După Vekstern și Baev, 1965).

BCU CLUJ / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

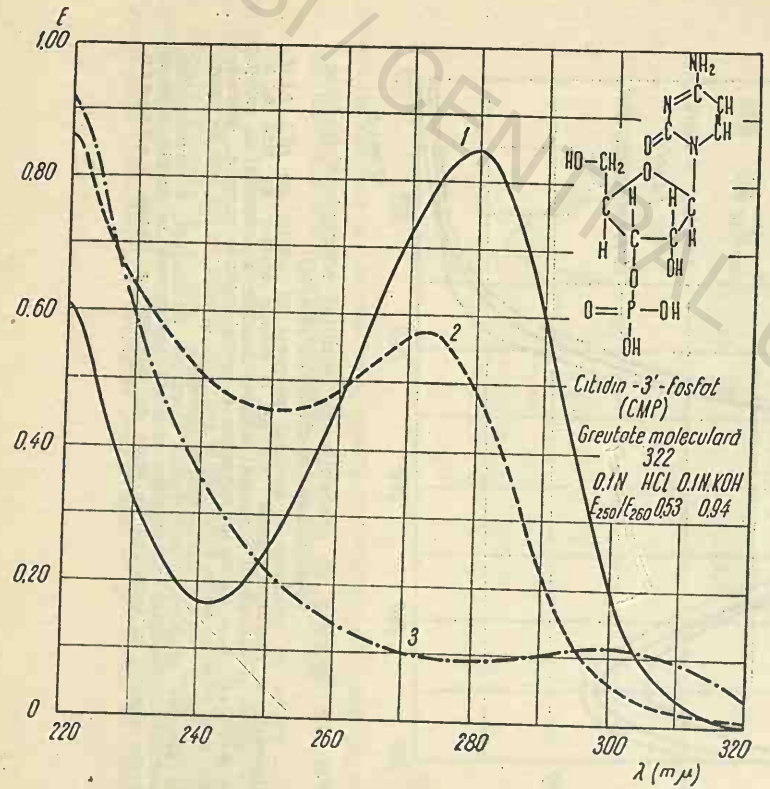


Fig. 11. Spectrul de absorbție al acidului citidin-3′-fosforic (2-amino-6-oxipirimidinribozid-3′-fosfat) (explicații v. la fig. 10).

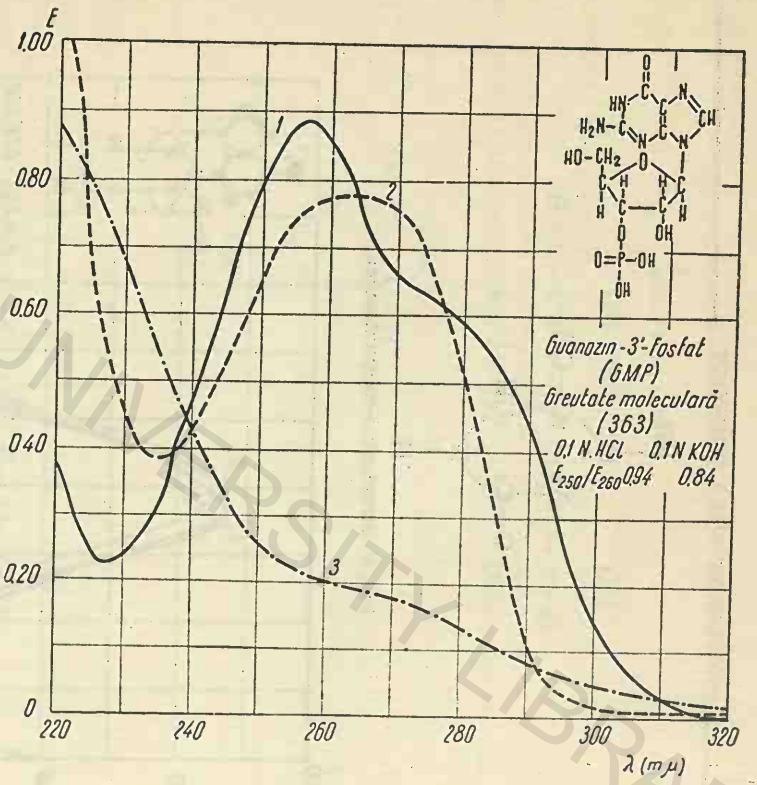


Fig. 12. Spectrul de absorbție al acidului guanozin-3′-fosforic (2-amino-6-oxipurinribozid-3′-fosfat) (explicații v. la fig. 10).

lor a acidului fosforic. Astfel, citidina-5′-fosfatul se mai numește și acidul citidinfosforic, uridina-5′-fosfatul — acid uridinfosforic etc. Fiecare nucleotidă are un spectru de absorbție caracteristic.

Spectrele de absorbție ale acizilor guanozinfosforic, citidinfosforic și uridinfosforic sînt redate în figurile 10, 11, 12.

Principiul metodei. Acidul ribonucleic este hidrolizat în mediu alcalin și nucleotidele pirimidinice rezultate sînt precipitate sub formă de sare de bariu.

Reactivi necesari: 1) Hidroxid de bariu, soluție 0,6 *N*; 2) Acid sulfuric, soluție 6 *N*; 3) Acid fosfowolframic, preparat; 4) Alcool etilic 96%; 5) Eter etilic; 6) Sulfat de amoniu, soluție 1%; 7) Brucină, soluție 10%, preparată în alcool.

Modul de lucru

1.2.8.1. Separarea acidului citidilic

În 500 ml soluție fierbinte de $Ba(OH)_2$ 0,6 *N* se introduc 50 g acid ribonucleic obținut din drojdia de bere după metoda Chantrenne. Amestecul se fierbe pe o baie de apă, timp de 2 ore, recipientul fiind prevăzut cu un refrigerent cu reflux. Amestecul se răcește apoi la 0°C. Precipitatul care apare după răcirea amestecului are un aspect granular și reprezintă sarea de bariu a nucleotidelor. El este separat prin filtrare și spălat cu cantități mici de soluție de clorură de bariu 0,6*N*. Ulterior, preparatul spălat se amestecă cu 200 ml apă fierbinte, amestecul este acidulat cu soluție de H_2SO_4 6*N* pînă la înroșirea hîrtiei Congo și sarea de bariu insolubilă (care se formează) este separată prin filtrare. Filtrarea se face cu ajutorul pămîntului de diatomee. Precipitatul de sulfat de bariu reținut pe filtru se spală de 2 ori cu apă distilată fierbinte. Filtratul și apele de spălare se reunesc, sînt răcite la 0°C și refiltrate pentru îndepărtarea materialului insolubil rezultat după răcire.

Filtratul obținut se încălzește din nou la fierbere. La soluția fierbinte se adaugă 20 g de acid fosfowolframic, dizolvate într-un volum minim de apă distilată. Adăugarea acidului fosfowolframic se face treptat, pînă cînd încetează formarea precipitatului. După răcirea soluției precipitatul este separat prin filtrare pe pămînt de diatomee și filtratul rezultat este concentrat sub vacuum pînă la un volum de aproximativ 180—200 ml. Se adaugă apoi 7,5 ml H_2SO_4 concentrat (sau o cantitate echivalentă pentru a obține o soluție în care concentrația finală a H_2SO_4 este 1 *N*). Soluția care este fierbinte după adăugarea H_2SO_4 este tratată cu 45 g de acid fosfowolframic și imediat filtrată prin pămînt de diatomee pentru separarea sărurilor fosfowolframice ale nucleotidelor purinice. Timp de cîteva ore, filtratul se lasă în repaus, la temperatura camerei, și, ulterior, este conservat în frigider, timp de 8—10 ore. Fosfowolframatul acidului citidilic, un precipitat gelatinos, este separat prin centrifugare (în centrifuga

cu răcire). Precipitatul din tubul de centrifugă este spălat cu soluție răcită de H_2SO_4 *N* și utilizat în continuare pentru prepararea acidului citidilic.

Deoarece fosfowolframatul acidului citidilic este ușor solubil în soluție normală de acid sulfuric la temperatura camerei se recomandă pentru conservare în precipitat prelucrarea acestuia la o temperatură cît mai scăzută.

Apele de spălare rezultate în procesul obținerii fosfowolframatului de acid citidilic sînt colectate și conservate pentru prepararea ulterioară a acidului uridilic.

Reziduul obținut după centrifugarea fosfowolframatului acidului citidilic este dizolvat în 400 ml apă distilată fierbinte și pentru precipitarea excesului de acid fosfowolframic la amestec se adaugă imediat și în exces soluție de sulfat de amoniu 1%. Ionii sulfatului, a căror prezență este nedorită în mediul de reacție, sînt îndepărtați prin filtrare după tratarea prealabilă a amestecului cu $Ba(OH)_2$, soluție 0,6*N*. Filtratul este concentrat în vacuum pînă la un volum de aproximativ 20 ml, apoi este decolorat prin tratare cu norit, iar acidul citidilic precipitat, prin adăugarea de alcool etilic. Cristalele de acid citidilic sînt spălate cu soluție apoasă de alcool etilic 30%, uscate prin spălare cu alcool etilic 96% și cu eter etilic pur. Din soluția-mumă, rămasă după prima precipitare, prin tratare cu alcool etilic mai poate precipita o cantitate neînsemnată de acid citidilic.

Recristalizarea acidului citidilic se realizează din soluția apoasă 2% a acestuia, prin adăugarea la soluție a unui volum egal sau puțin mai mare de alcool etilic.

Randamentul metodei este, în general, satisfăcător. Cantitatea de acid citidilic obținută după două precipitări succesive reprezintă aproximativ 4,5% din cantitatea acidului ribonucleic luat inițial.

1.2.8.2. Separarea acidului uridilic

Părțile alicote și apele de spălare rezultate după precipitarea fosfowolframatului acidului citidilic se încălzesc pe o baie de apă la temperatura de 70°—80°C și sînt tratate imediat cu soluție de sulfat de amoniu 1% pentru precipitarea excesului de acid fosfowolframic sub formă de fosfowolframat de amoniu. Adăugarea soluției de sulfat de amoniu se face treptat, în porții mici. Ionii de sulfat sînt îndepărtați prin tratarea soluției cu $Ba(OH)_2$ 0,6*N*, iar precipitatul care rezultă este tratat din nou cu aceeași soluție $Ba(OH)_2$. Amestecul este filtrat și filtratul împreună cu apele de spălare, al căror volum este de aproximativ 600 ml, sînt ușor alcalinizate cu soluție alcoolică de brucină 10%. După 10—12 ore, timp în care soluția se conservă la 0°C în frigider, cristalele de bruciluridilat sînt separate prin filtrare.

1.2.9. SEPARAREA NUCLEOTIDELOR PURINICE. METODA BUELL

Acizii nucleici — *ARN* și *ADN* — conțin două baze purinice, adenina și guanina. Nucleotidele purinice sînt formate dintr-o bază azotată, glucidul corespunzător acidului nucleic hidrolizat (riboza sau dezoxiriboza) și acid fosforic. Structura chimică a nucleotidelor adeninei și guaninei este redată schematic în figura 13.

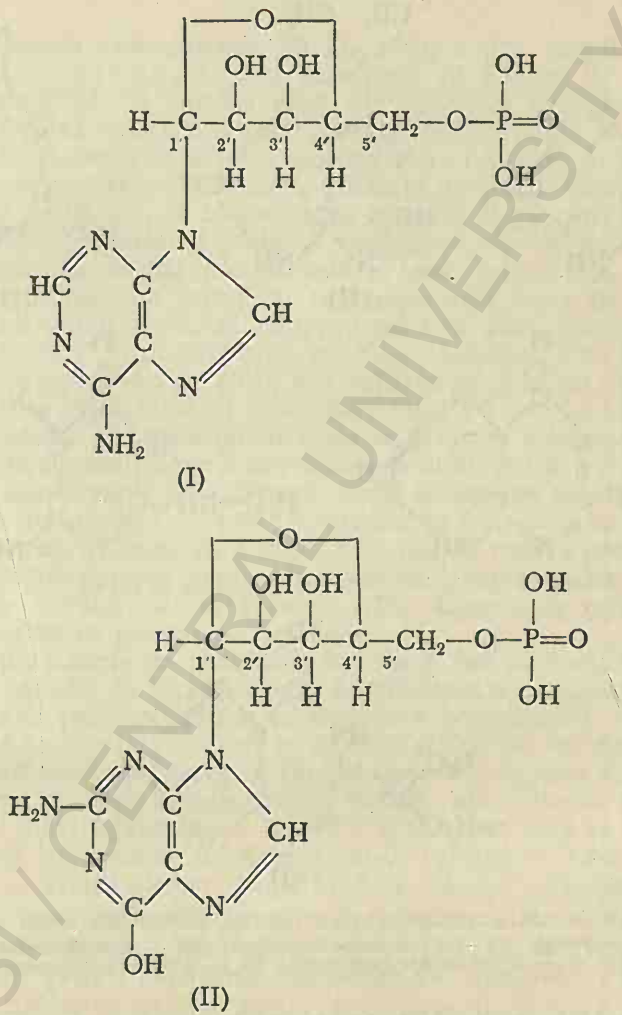


Fig. 13. Structura chimică a nucleotidelor purinice:
I — adenozină-5'-fosfat (acid adenozin-monofosforic); II — guanozină-5'-fosfat (acid guanozin-monofosforic).

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

În compoziția nucleotidelor purinice, obținute după hidroliza acizilor nucleici, au fost identificate recent și alte baze purinice, care sînt de fapt derivați ai adeninei și guaninei. Aceste baze care au fost denumite „atipice" sînt în număr de șase: 6-metilaminopurina (14, I); 6,6-dimetilaminopurina (II); 2-metiladenina (III); 1-metilguanina (IV); 2-metilamino-6-oxipurina (V) și 2-dimetilamino-6-oxipurina (VI) (fig. 14 I, II, III, IV, V, VI).

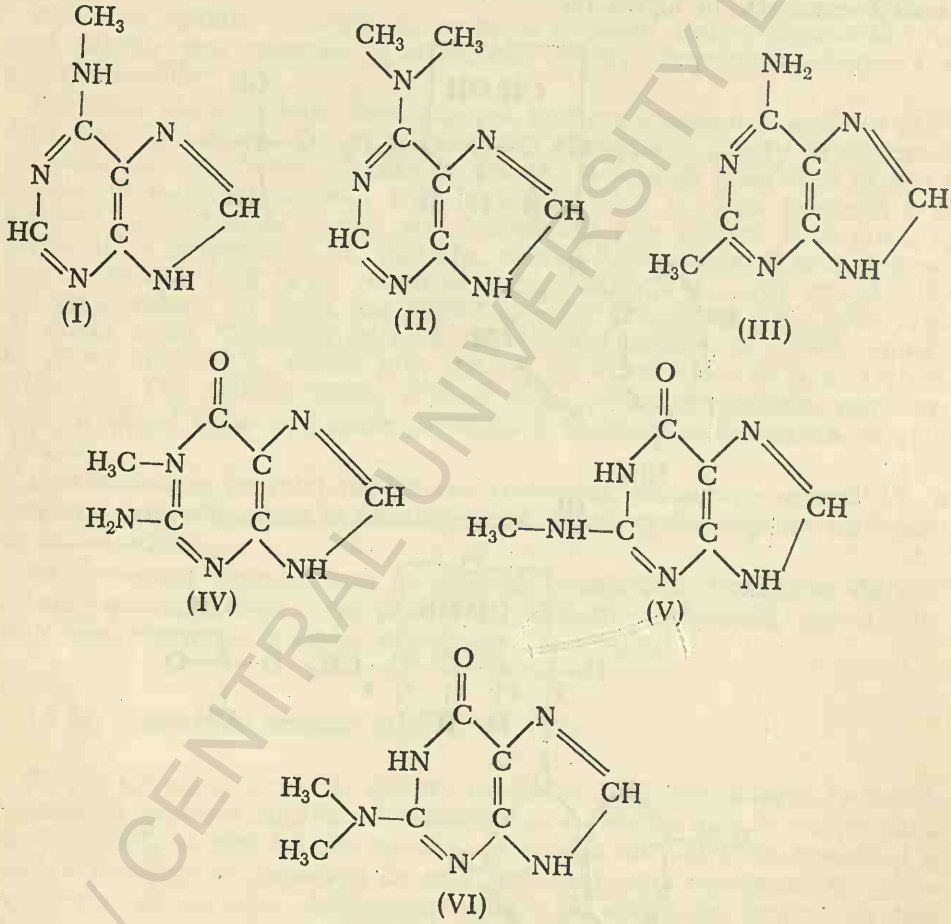


Fig. 14. Bazele purinice „atipice" izolate recent din acizii nucleici:
I — 6-metilaminopurină; II — 6,6-dimetilaminopurină; III — 2-metiladenină; IV — 1-metilguanină; V — 2-metilamino-6-oxipurină; VI — 2,2-dimetilamino-6-oxipurină.

Principiul metodei. Nucleotidele adeninei și guaninei sînt precipitate din hidrolizatul alcalin al acidului ribonucleic sub formă de săruri ale metalelor grele.

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Reactivi necesari: 1) Acid ribonucleic; 2) Hidroxid de sodiu în preparat; 3) Acid acetic glacial; 4) Alcool etilic 95%; 5) Acid picric, soluție saturată; 6) Reactiv aluminiu-picrat; 7) Acid picric, soluție 0,5%; 8) Formol; 9) Acetat de plumb, în preparat; 10) Acetat de plumb, soluție neutră (v. metoda Bertrand — reactivi).

Modul de lucru

1.2.9.1. Separarea nucleotidului adeninei

Acidul rîbonucleic (aproximativ 20 g), obținut din drojdia de bere după metoda Chantrenne, este amestecat cu 500 ml de apă distilată. Se adaugă KOH (în rotulis) pînă cînd întreaga cantitate de acid ribonucleic se dizolvă complet. Reacția soluției finale trebuie să fie neutră față de hîrtia de turnesol. Se adaugă în continuare hidroxid de sodiu pînă la obținerea unei concentrații finale a acestuia de 0,3*N*. Soluția se lasă în repaus, timp de 24 ore, la temperatura camerei, după care se neutralizează cu acid acetic glacial și volumul final al soluției se notează.

După adăugarea la soluția neutralizată a unui volum egal de alcool etilic 95%, se formează un precipitat care reprezintă sarea de acetat de potasiu a nucleotidului guaninei. După separarea prin filtrare a sării acetatului de potasiu a nucleotidului guaninei, filtratul este concentrat sub vacuum la temperatura de 50°C, sau liofilizat pînă la un volum final de 200 ml. Acesta este tratat în continuare cu 1,5 l soluție saturată de acid picric și reactiv aluminiu-picrat (care se prepară prin adăugarea la o soluție saturată de acid picric a acetatului de aluminiu în exces). Precipitatul format este separat prin filtrare. După adăugarea reactivului aluminiu-picrat în hidrolizatul de acid ribonucleic se formează un precipitat abundent de culoare galbenă, care după 2—3 ore de repaus poate fi ușor separat prin centrifugare și pentru îndepărtarea impurităților spălat de 3 ori cu soluție fierbinte de acid picric 0,5%. Înainte de centrifugarea soluției este necesar ca probele să fie răcite.

Precipitatul (în funcție de cantitatea în care a fost obținut) se dizolvă într-un volum variabil de formol. Sarea de aluminiu a nucleotidului adeninei este separată prin precipitare cu acetonă și centrifugare. Partea alicotă este tratată în repetate rînduri cu acetonă și formol, iar precipitatele care se formează sînt separate prin centrifugare. Preparatul obținut este spălat cu acetonă și uscat într-un curent de aer cald. Ulterior se dizolvă în apă distilată caldă (aproximativ 2,5—3 l) și în acest scop se adaugă în porții mici KOH (în rotulis), după care *p*H-ul soluției se aduce la 5 cu ajutorul acidului acetic glacial. După răcirea soluției, precipitatul care se formează (hidroxidul de aluminiu) se separă prin filtrare și este îndepărtat, iar filtratul rezultat, limpede și incolor, este folosit împreună cu apele de spălare pentru separarea cristalelor de nucleotid adenină. În acest scop, la filtrat se adaugă acetat de plumb, în preparat, și sarea nucleotidului adeninei precipită. Soluția este barbotată cu hidrogen sulfurat pentru îndepărtarea plumbului în exces, apoi barbotată energic cu aer și, în final, concentrată în vacuum la 40°C sau liofilizată pînă la

obținerea unui volum cît mai redus. La rece nucleotidul adeninei cristalizează. Recristalizarea preparatului se realizează din soluția acestuia, preparată în apă distilată fierbinte.

Randamentul metodei este relativ mic, din cele 20 g de acid ribonucleic utilizate inițial se obțin aproximativ 1,2 g de adeninnucleotid.

1.2.9.2. Separarea nucleotidului guaninei

Sarea guaninei, obținută după precipitarea din hidrolizatul acidului ribonucleic cu un volum egal de alcool etilic 96% (v. mai sus), se dizolvă în 50—75 ml de apă distilată fierbinte. Soluția rezultată se filtrează, se acidulează cu acid acetic glacial și se tratează cu soluție neutră de acetat de plumb pînă la apariția unui precipitat de sare de plumb. Sarea de plumb formată este spălată cu apă distilată fierbinte și apele de spălare, după răcire, sînt centrifugate pentru separarea precipitatului. Precipitatul este amestecat cu un volum mic de apă distilată și sarea de plumb este scindată prin barbotarea soluției cu hidrogen sulfurat. După barbotarea energică cu aer a soluției, nucleotidul guaninei este precipitat cu soluție alcalină de acetat de plumb. Sarea care se formează este spălată și barbotată din nou cu hidrogen sulfurat și cu aer. Soluția se filtrează. Filtratul este tratat, la temperatura camerei, cu azotat de argint pînă la apariția unui precipitat. Sarea de argint este spălată cu apă distilată caldă, pînă la dispariția în apele de spălare a substanțelor coloidale. Ulterior, sarea de argint se dizolvă în apă distilată caldă și din nou amestecul este barbotat cu hidrogen sulfurat, apoi cu aer și, în final, concentrat la 40°C în vacuum pînă la obținerea unui volum cît mai redus. Nucleotidul guaninei cristalizează în decurs de cîteva ore. Recristalizarea lui se realizează din apă distilată fierbinte, prin simpla răcire a soluției.

1.2.10. SEPARAREA NUCLEOTIDELOR PE CALE ENZIMATICĂ. METODA HURST, LITTLE și BUTLER

Principiul metodei. Sarea de magneziu a oligonucleotidelor este hidrolizată pe cale enzimatică și mononucleotidele sînt separate pe coloană cu schimbători de ioni.

Reactivi necesari: 1) Oligonucleotide, sare de magneziu; 2) Soluție de amoniac concentrat; 3) Hidroxid de sodiu, soluție 0,1 *N*; 4) Rășină schimbătoare de ioni Dowex-1 (250—500 mesh); 5) Amoniac, soluție 1 *N*; 6) Acid acetic, soluție 1 *N*; 7) Acid acetic, soluție 0,5 *M*; 8) Acetat de sodiu, soluție 0,5 *M*; 9) Hidroxid de bariu, soluție saturată; 10) Alcool etilic absolut și soluție 70%.

Modul de lucru

Prepararea soluției de enzimă. Fosfataza este preparată din țesutul renal al șobolanului alb. Rinichii șobolanului sînt mojarați în prezența unui

volum de apă distilată de 5 ori mai mare decît volumul țesutului luat pentru extragerea fosfatazei. Maceratul tisular se lasă în repaus trei zile, la 5°C, după care suspensia se aduce la *p*H=9 cu ajutorul amoniacului concentrat. Extractul este centrifugat la o centrifugă cu răcire și partea alicotă este decantată și folosită ca soluție de enzimă.

1.2.10.1 Separarea mononucleotidelor

Se iau 250 mg sare de magneziu a oligonucleotidelor și se agită cu 25 ml apă distilată. Amestecul se aduce la *p*H=8,0—9,0 cu ajutorul unei soluții de hidroxid de sodiu 0,1*N*. La amestec se măsoară cu o pipetă 8 ml soluție de enzimă și volumul se completează pînă la 30 ml cu apă distilată, după care se încălzește pe o baie de apă, la 37°C, timp de 2 ore. După hidroliza oligonucleotidelor, care durează 6—8 ore, amestecul se aduce la *p*H=4,5 cu autorul soluției de acid acetic 1*N* și se introduce într-o coloană de schimbători de ioni Dowex-1.

Prepararea coloanei Dowex-1. Aproximativ 20 g de rășină schimbătoare de ioni Dowex-1 (250—500 mesh) sînt spălate atent cu apă distilată pentru îndepărtarea eventualelor impurități hidrosolubile și a particulelor minuscule. În continuare rășina schimbătoare de ioni este tratată de 3 ori cu soluție de amoniac 1*N*, apoi cu apă distilată și cu acid acetic soluție 1*N* și, în final, rășina este spălată cu apă distilată. Rășina schimbătoare de ioni împreună cu un volum corespunzător de apă este introdusă într-o coloană cromatografică cu diametrul de 1,15 cm. După completa sedimentare a rășinii schimbătoare de ioni, în coloană se introduce acid acetic, soluție *N* și rășina este spălată pînă cînd *p*H-ul (acid) soluției introduse și al eluatelor colectate este același. Coloana este apoi spălată cu apă distilată pînă cînd aciditatea apelor de spălare dispare sau este cu totul neglijabilă. Ulterior, prin coloană se trece o soluție de amoniac 1*N*. Se spală coloana de rășină schimbătoare de ioni cu această soluție pînă în momentul în care alcalinitatea soluției introduse este egală cu alcalinitatea apelor de spălare. Coloana cu rășină schimbătoare de ioni este spălată bine cu apă distilată, după procedeul expus mai sus și tratată din nou cu soluție de acid acetic 1*N* pînă cînd eluatele au aceeași aciditate cu soluția utilizată. În final, coloana schimbătorului de ioni este eluată cu apă distilată, care nu conține bioxid de carbon, pînă cînd aciditatea apelor de spălare este cu totul neglijabilă. Proba pentru stabilirea alcalinității și acidității eluatelor se face prin titrarea unor volume mici de eluat.

Separarea mononucleotidelor. Hidrolizatul oligonucleotidelor se introduce în coloana cu rășină schimbătoare de ioni. După ce întreaga soluție a hidrolizatului a parcurs coloana rășinei schimbătoare de ioni se procedează la eluția coloanei cu diferite soluții. Viteza de eluție, indiferent de natura soluției utilizate, nu trebuie să depășească 0,8—1 ml pe minut. Pentru îndepărtarea nucleotidelor se eluează coloana cu apă distilată. Verificarea prezenței nucleotidelor în eluate se face cu ajutorul spectrofotometrului la λ=260 mμ. Cînd valoarea extincției după utilizarea unei

soluţii atinge limita inferioară, se procedează la eluţia coloanei cu soluţii distincte pentru diferitele nucleotide. Se folosesc următoarele soluţii: 1) acid acetic, 0,5*M* pentru eluţia citozinei, care va forma *fracţia I;* 2) amestec de soluţii de acid acetic, 0,5*M* — acetat de sodiu, 0,05*M*, pentru eluţia adeninei — *fracţia a II-a;* 3) amestec de acid acetic, 0,5*M* — acetat de sodiu, 0,1 mg pentru eluţia timinei — *fracţia a III-a.* Eluţia completă a fiecărei fracţii este controlată în eluate cu ajutorul spectrofotometrului şi fracţiile sînt identificate după maximum de absorbţie al eluatelor în regiunea ultravioletă a spectrului.

1.2.10.2. Separarea sărurilor de bariu ale nucleotidelor

Eluatele sînt utilizate în continuare pentru prepararea sărurilor de bariu ale nucleotidelor. După evaporarea sub vacuum a eluatelor, la temperatura de 40—50°C, pînă la obţinerea unor volume relativ mici, soluţia fiecărui nucleotid este alcalinizată cu o soluţie saturată de hidroxid de bariu, în prezenţa fenolftaleinei. Se adaugă o cantitate mică de hidroxid de bariu în exces. Precipitatul care se formează reprezintă sarea de bariu a fosfaţilor anorganici, care se separă uşor prin centrifugare. Partea alicotă a centrifugatelor, care conţine nucleotide, este trecută într-un volum de alcool etilic de 2 ori mai mare decît volumul centrifugatelor reunite. Soluţia este conservată 12 ore, la temperatura de 5°C. Partea alicotă incoloră este decantată, şi precipitatul fluorescent este colectat prin centrifugare, spălat cu alcool etilic 70%, apoi cu alcool etilic absolut şi, ulterior, uscat în exicator sub vacuum, pe clorură de calciu şi hidroxid de sodiu.

1.2.11. SEPARAREA NUCLEOZIDELOR PE CALE ENZIMATICĂ. METODA KLEIN

Principiul metodei. Acidul nucleic este hidrolizat enzimatic şi nucleozidele sînt cristalizate după separarea lor din hidrolizat, prin fracţionare.

Reactivi necesari: 1) Soluţie tampon acetat de sodiu — acid acetic *p*H=4,7; 2) Acetat de sodiu, soluţie 0,04 *M*; 3) Acid dezoxiribonucleic, sarea de sodiu; 4) Soluţie tampon amoniac-sulfat de amoniu 1 *M* *p*H=8,9; 5) Sulfat de magneziu 0,1 *M;* 6) Reactivi pentru dozarea fosforului (v. metoda Fiske-Subbarow); 7) Alcool etilic, soluţii 80% şi 96%; 8) Acetat de plumb, soluţie bazică; 9) Hidroxid de bariu, soluţie 10%; 10) Orcină, soluţie (v. metoda Mejbaum); 11) Acid sulfuric, soluţie 4 *N*; 12) Acid picric, soluţie saturată; 13) Azotat de argint, în preparat.

Modul de lucru

Prepararea soluţiei enzimatice. Extractul glicerinic al mucoasei intestinale de viţel (600 ml) este tratat cu un volum egal de agent precipitant — soluţie tampon de acetat de sodiu, *p*H=4,7, la care se adaugă acid acetic glacial (un volum egal cu 0,001 din volumul total al soluţiei

tampon care va fi utilizată). Amestecul extractului glicerinic cu soluția tampon este agitat energic și centrifugat. Se obține un precipitat care trebuie spălat o singură dată cu soluție tampon de acetat de sodiu, 0,04*M* (*p*H=4,7) și de două ori cu apă distilată. După aceea precipitatul este agitat într-un recipient în prezența unui litru de apă distilată, și în cazul cînd nu se dizolvă complet la soluție se adaugă amoniac diluat. Soluția de enzimă astfel obținută se utilizează pentru hidroliza acidului dezoxiribonucleic care este însoțită de formarea de dezoxiribozide. Schema separării diferitelor dezoxiribozide este redată în figura 15.

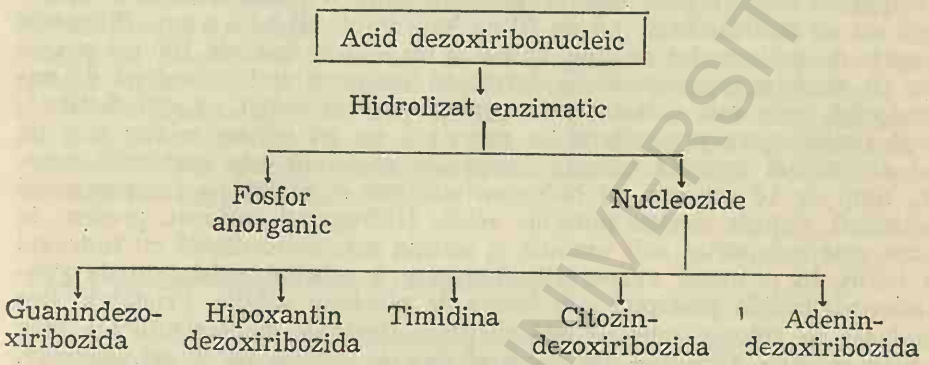


Fig. 15. Schema separării diferitelor dezoxiribozide din hidrolizatul enzimatic al acidului dezoxiribonucleic.

Prepararea amestecului de nucleozide. Circa 10 g sare de sodiu a acidului dezoxiribonucleic sînt dizolvate în aproximativ 100 ml de apă distilată; amestecul se aduce, cu soluție de amoniac diluat și în prezența fenolftaleinei, la o colorație ușor roză. Se adaugă apoi 125 ml de soluție tampon 1*M* [NH_3—$(NH_4)_2SO_4$] cu un *p*H de 8,9 și 125 ml soluție de $MgSO_4$ 0,1*M*. Ulterior, la amestec se adaugă soluție de enzimă, proaspăt preparată, și volumul lui final se aduce la 500 ml cu apă distilată. Pentru hidroliza acidului dezoxiribonucleic amestecul este incubat la 37°C, timp de 14—15 ore. Stadiul hidrolizei se controlează dozîndu-se, din timp în timp, cantitatea de fosfor anorganic care crește pe parcursul incubării (v. metoda Fiske-Subbarow).

Hidrolizatul se filtrează și se evaporă sub vacuum la temperatura de 40°C pînă la obținerea unui volum de aproximativ 200—250 ml. Apoi se adaugă (cu pipeta) 10 ml soluție de $MgSO_4$ 1*M* și amestecul se lasă în repaus timp de cîteva ore în frigider, după care se filtrează, și excesul de amoniac este îndepărtat prin evaporare sub vacuum. Filtratul este liofilizat pînă la obținerea unui volum de 90—100 ml. Se introduce în frigider pentru 10—12 ore și, în final, se obține un congelat consistent care se utilizează pentru separarea nucleozidelor.

1.2.11.1. Separarea guanindezoxiribozidei

Congelatul consistent care se obține după conservarea hidrolizatului la temperaturi scăzute, în frigider, este centrifugat într-o centrifugă cu răcire (2—4°C) și spălat cu cantități relativ mici de soluții alcoolice 80% și 96% reci. Centrifugatele sînt reunite și evaporate pînă la obținerea unui volum de 40—50 ml, iar congelatul obținut este tratat din nou după procedura de mai sus. Congelatele reunite sînt dizolvate în 200 ml de apă distilată și tratate cu acetat de plumb, soluție bazică. După 15 minute precipitatul format este separat prin decantarea părții alicote și spălat de 3 ori cu apă distilată, pe un filtru la o pîlnie Büchner. Filtratele și apele de spălare sînt reunite, aduse la un volum final de 100 ml și tratate cu amoniac concentrat. Se formează un precipitat abundent de culoare albă, care este colectat prin centrifugare și spălat cu apă distilată. După centrifugare precipitatul se amestecă cu un volum relativ mic de apă distilată și se agită energic. Suspensia rezultată este barbotată energic, timp de 10 minute, cu hidrogen sulfurat și răcită pe tot parcursul barbotării. Soluția devine puternic acidă. Hidrogenul sulfurat, prezent în exces, este îndepărtat sub vacuum și soluția este neutralizată cu hidroxid de bariu. În procesul evaporării ulterioare a soluției, cristalele de guanindezoxiribozidă precipită sub formă de plachete subțiri. Cristalele sînt dizolvate în volume mici de apă distilată fierbinte și recristalizate prin răcirea soluției. Operația de recristalizare se repetă de 3 ori succesiv. Din soluția-mumă inițială se mai pot obține prin prelucrări suplimentare cantități neînsemnate de guanindezoxiribozidă. În total, din preparatul inițial de acid dezoxiribonucleic (10 g sare de sodiu) se obțin 200—250 mg de guanindezoxiribozidă.

1.2.11.2. Separarea hipoxantindezoxiribonucleozidei

Părțile alicote, obținute după separarea precipitatelor congelate ale guanindezoxiribonucleozidului care conțin și hipoxantindezoxiribonucleozidă, citozindezoxiribonucleozidă și timidină, sînt reunite. Pentru îndepărtarea alcoolului și amoniacului, adăugate anterior, soluția este evaporată, concomitent adăugîndu-se, picătură cu picătură, soluție de hidroxid de bariu pentru îndepărtarea sulfaților de amoniu și de magneziu. Excesul de hidroxid de bariu care eventual se formează este neutralizat prin barbotarea soluției cu bioxid de carbon. Este necesar și după barbotarea soluției cu CO_2 ca reacția acesteia să se mențină ușor alcalină. Soluția barbotată este filtrată, iar precipitatul reținut pe filtru se spală cu apă distilată pînă cînd apele de spălare nu mai dau reacția pozitivă cu orcină (v. reacția pentozelor cu orcina). Filtratul și apele de spălare sînt evaporate pînă la un volum de 15—20 ml, precipitatul care se formează fiind îndepărtat prin centrifugare. Soluția este răcită la 0°C cu ajutorul zăpezii carbonice, acidulată cu H_2SO_4 soluție 4*N* (circa 2—3 ml)

pînă la apariţia unei coloraţii uşor roză faţă de hîrtia de turnesol, cînd se adaugă un volum de 4 ori mai mare de alcool etilic absolut şi soluţia devine opalescentă. Se introduce în frigider unde se expune timp de 8—10 ore, după care se observă apariţia unor cristale aciculare. Randamentul metodei este de aproximativ 600 mg de hipoxantindezoxiribozidă cristalizată.

1.2.11.3. Separarea timidinei

Din soluţia alcoolică-mumă, rezultată după separarea cristalelor de hipoxantindezoxiribozidă, se recoltează 7—8 ml, care se introduc în vînă subţire în 15—20 ml de alcool absolut, agitîndu-se concomitent. Precipitatul amorf care se formează este îndepărtat şi soluţia alcoolică este evaporată pînă la un volum de 2,5 ml. Se obţine un lichid galben-portocaliu, de o consistenţă vîscoasă, în care după cîteva zile de conservare la rece se observă apariţia cristalelor prismatice de timidină. Se obţin aproximativ 500 mg de timidină pură.

1.2.11.4. Separarea citozindezoxiribozidei

La lichidul rămas după separarea timidinei se adaugă 50 ml de alcool etilic absolut şi soluţie saturată de acid picric pînă la apariţia unor cristale galbene, de picrat de citozindezoxiribonucleozidă, aproximativ 700—800 mg.

Picratul dezoxiribozidei se dizolvă în apă distilată caldă şi după răcirea soluţiei se adaugă, în volume mici, acid sulfuric. După adăugarea acidului sulfuric se formează acid picric liber care sedimentează spontan. Excesul de acid sulfuric se neutralizează cu apă de barită şi soluţia apoasă este evaporată. La volumul obţinut după evaporarea soluţiei se adaugă alcool etilic absolut şi evaporarea soluţiei se repetă. Lichidul de culoare brună şi de consistenţă vîscoasă este lăsat în repaus la rece, cu timpul el transformîndu-se într-o masă de cristale, care sînt după aceea mojarate şi dizolvate într-un volum minim de alcool etilic absolut. Soluţia rezultată care este puternic colorată se decantează, iar precipitatul uşor colorat se recristalizează de 3 ori din alcool etilic absolut. Cristalele de citozindezoxiribozidă, care se prezintă sub forma unor prisme alungite, sînt separate din alcool etilic prin centrifugare, obţinîndu-se în final, aproximativ, 250 mg.

1.2.11.5. Separarea adenindezoxiribonucleozidei

Se iau 10 g sare de sodiu a acidului dezoxiribonucleic şi sînt dizolvate într-un amestec compus din 125 ml de soluţie tampon (amoniac-sulfat de amoniu), 125 ml de soluţie de sulfat de magneziu 0,1*M* şi 60 ml solu-

ţie de enzimă, obţinută din mucoasa intestinală de viţel (v. prepararea soluţiei enzimatice). La amestec se adaugă 0,2 g azotat de argint dizolvate într-un volum de 5 ml de amoniac. Volumul final al amestecului rezultat este de circa 500 ml. Amestecul este incubat în termostat, la 45°, timp de 14—15 ore. După răcirea amestecului la temperatura camerei se formează un precipitat amorf care este îndepărtat. Soluţia este evaporată sau liofilizată la un volum final de 5 ml şi ulterior adusă cu alcool etilic absolut la un volum final de 100 ml. Precipitatul care se formează se separă prin filtrare, iar filtratul rezultat se evaporă pînă la un volum de 5—10 ml. Filtratul este lăsat în repaus 7—15 zile la temperatură scăzută (în frigider), după care se observă cu ochiul liber apariţia cristalelor de adenindezoxiribozidă. Cristalele sînt dizolvate în soluţie de alcool etilic absolut şi recristalizate de 3 ori. Dacă metoda este aplicată corect, se obţin, aproximativ, 300—400 mg preparat final.

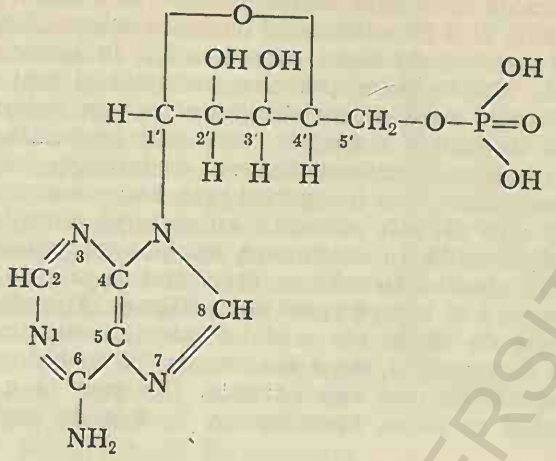
1.2.12. SEPARAREA ACIDULUI ADENILIC. METODA LAUFER ŞI STEWART

Printre produsele de degradare a acidului ribonucleic, în cazul hidrolizei menajate, se numără şi acidul adenilic, a cărui structură chimică este în funcţie de proveniența materialului. Hidroliza menajată a acidului ribonucleic extras din muşchi decurge cu formare de acid adenozin-5′-fosforic, în timp ce după hidroliza acidului adenilic, izolat din drojdia de bere, rezultă un acid care are o structură diferită, molecula de acid fosforic fiind situată la nivelul atomului de carbon din poziţia C_3' (fig. 16).

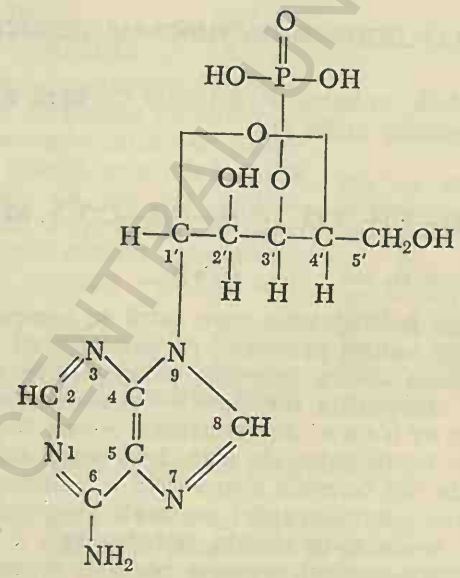
Principiul metodei. Nucleotidele purinice şi pirimidinice rezultate după hidroliza alcalină a ARN sînt separate datorită gradului de solubilitate diferită a sărurilor de cupru.

Reactivi necesari: 1) Acid ribonucleic, în preparat; 2) Hidroxid de sodiu, soluţie 50% şi 1%; 3) Sulfat de cupru, soluţie 1% şi 25%; 4) Sulfat acid de sodiu, soluţie 25%; 5) Alcool etilic absolut; 6) Acetat de plumb, soluţie neutră (v. prepararea în metoda Bertrand).

Modul de lucru. Se iau 13 g de acid nucleic în preparat, obţinut din drojdia de bere după metoda Chantrenne şi se amestecă cu 320 ml de apă distilată, la care, ulterior, se adaugă hidroxid de sodiu, soluţie 50%, pînă la aducerea soluţiei la un *p*H=9—10. Soluţia obţinută se încălzeşte la 50°C şi se tratează la cald cu 80 ml sulfat de cupru soluţie 1% şi, ulterior, cu hidroxid de sodiu 50% în aşa fel încît fiecare 100 ml de soluţie să conţină în final 1,1 g NaOH. Sarea de cupru a nucleotidelor purinice care se formează ca urmare a acestor operaţii este insolubilă şi sedimentează, iar în soluţie rămîne în stare dizolvată sarea de cupru a nucleotidelor pirimidinice. Precipitatul sărurilor de cupru ale nucleotidelor purinice se separă prin centrifugare şi se tratează cu hidroxid de sodiu 1%. După aceea soluţia se acidulează cu H_2SO_4 pînă la dispariţia completă a opalescenţei (*p*H=5,7) şi se încălzeşte pe o baie de apă la



a)



b)

Fig. 16.

a — structura chimică a acidului adenilic izolat din *ARN* muscular (acid adenozin-5'-fosforic); *b* — structura acidului adenilic izolat din drojdia de bere (acid adenozin-3'-fosforic).

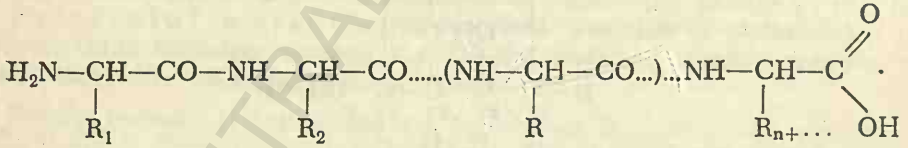
BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

60°C. La soluția caldă se adaugă 50 ml amestec de reactivi (42 ml soluție sulfat de cupru 25% și 8 ml sulfat acid de sodiu soluție 25%), *p*H soluției controlîndu-se și menținîndu-se tot timpul la 5,7. În aceste condiții, sărurile de cupru ale nucleotidelor purinice precipită și sînt separate prin centrifugare. Ulterior, acestea sînt dizolvate într-un volum mic de apă distilată. Rezultă de fapt o suspensie, care este barbotată energic, timp de 10 minute, cu hidrogen sulfurat. Excesul de hidrogen sulfurat, prezent în soluție după barbotare, este îndepărtat prin barbotarea energică a acesteia cu aer, după care *p*H este adus la 7 cu ajutorul soluțiilor de hidroxid de bariu și acetat de sodiu. În continuare, soluția este tratată cu un volum egal de alcool etilic absolut. Rezultă un precipitat de sare de sodiu a guanilatului care se separă și îndepărtează prin filtrare. Filtratul care conține cantități însemnate de săruri ale acidului adenilic este tratat cu soluție neutră de acetat de plumb și, după barbotarea lui cu hidrogen sulfurat și cu aer, este evaporat la rece sub vacuum. Din cele 13 g de acid ribonucleic luate inițial se obțin, aproximativ, 7—8 g de acid adenilic pur.

1.3. PROPRIETĂȚI FIZICO-CHIMICE ALE PROTEIDELOR

1.3.1. DETERMINAREA PUNCTULUI IZOELECTRIC

Catena polipeptidică, unitatea structurală de bază a proteinelor, poate fi reprezentată schematic astfel (1):

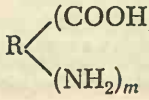


(1)

Numărul unităților polipeptidice care intră în compoziția unei proteine variază în funcție de natura proteinei, de proveniența acesteia, iar modalitatea de interacțiune dintre catenele polipeptidice este, de asemenea, diferită. Astfel, în compoziția insulinei — proteina hormon secretată de insulele lui Langerhans din pancreas — au fost identificate două catene polipeptidice legate între ele prin două punți sulfidice (fig. 17).

După cum se vede din formula structurală a insulinei (fig. 17), în molecula acestei proteine există grupări carboxil și grupări amino care nu sînt blocate și prin urmare, în soluție, pot disocia.

În general, structura oricărei proteine poate fi reprezentată sumar prin formula (2):



(2)

Prezența grupărilor funcționale libere (—COOH, —NH_2) condiționează o gamă diversă de proprietăți fizico-chimice ale proteinelor. Astfel, grupările carboxil ale proteinei pot reacționa cu bazele formînd săruri, numite proteinați, sau pot disocia cu formare de ioni de hidrogen, dînd proteinei proprietățile unui acid, în timp ce grupările amino reacționează cu acizii, micșorînd concentrația ionilor de hidrogen în soluție și, în consecință, aceste grupări condiționează proprietățile bazice ale proteinei.

În funcție de raportul dintre grupările carboxil și amino, ca și în cazul aminoacizilor, proteina respectivă se comportă fie ca un acid, fie ca o bază. De exemplu, în cazul cînd gruparea carboxil disociază, proteina posedă sarcină electrică negativă (3):

$$R\begin{matrix}(COOH)_n\\(NH_2)_m\end{matrix} \rightleftarrows R\begin{matrix}(COO^-)_n\\(NH_2)_m\end{matrix} + nH^+ \quad (3)$$

Gradul de disociere a grupării carboxil este condiționat de aciditatea mediului de reacție: dacă concentrația ionilor de hidrogen în mediul de reacție este mică, adică apropiată ca valoare de un *p*H neutru, gradul de disociere a grupării carboxil crește, și invers, dacă mediul este puternic acid, disocierea grupării —COOH este redusă.

Gruparea amino (—NH_2) poate, de asemenea, disocia, și molecula proteică posedă în acest caz o sarcină electrică pozitivă (4):

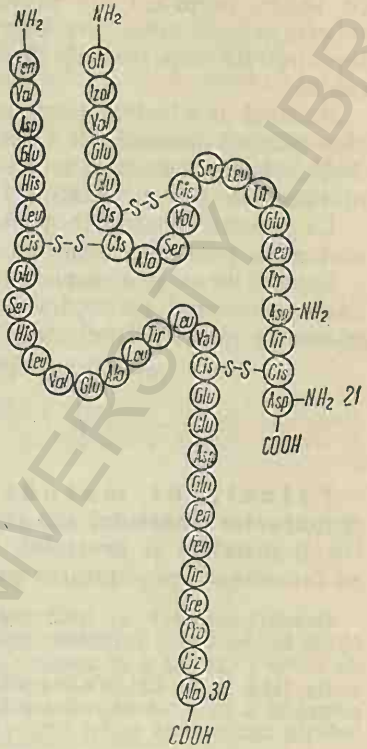


Fig. 17. Compoziția chimică a moleculei de insulină și legăturile dintre cele două catene polipeptidice:

Fen — fenilalanină; *Val* — valină; *Asp* — asparagină; *Glu* — acid glutamic; *His* — histidină; *Leu* — leucină; *Cis* — cisteină; *Ser* — serină; *Ala* — alanină; *Tir* — tirozină; *Tre* — treonină; *Pro* — prolină; *Liz* — lizină; *Gli* — glicocol; *Izol* — izoleucină.

$$R—NH_3OH \rightleftarrows RNH_3^+ + OH^- \quad (4)$$

Disocierea grupării amino va fi cu atît mai intensă cu cît concentrația ionilor hidroxil va fi mai mică (mediu acid), și invers, se va micșora cînd concentrația acestora în soluție va crește (mediu alcalin).

Sarcina electrică globală a oricărei proteine reprezintă suma algebrică a sarcinilor pozitive și negative și depinde de reacția mediului: în mediu alcalin proteina posedă o sarcină electrică negativă, în mediu acid — o sarcină electrică pozitivă. Există însă o concentrație a ionilor de hidrogen, caracteristică pentru fiecare proteină, la care suma algebrică a sarcinilor

de semne contrarii ale proteinei este egală cu zero. *p*H-ul *mediului de reacție în care suma sarcinilor electrice pozitive este egală cu suma sarcinilor electrice negative ale proteinei se numește punctul izoelectric al proteinei.*

Punctul izoelectric (care se notează cu p_i) reprezintă o constantă fizico-chimică deosebit de importantă, caracteristică pentru fiecare proteină. Astfel, p_i al hemoglobinei este situat la *p*H=6,8; al miozinei, la *p*H=6,1, al cazeinei, 4,7, al gelatinei, 4,6, iar al globulinei serice, la *p*H=5,5 etc.

La punctul izoelectric, proteina precipită datorită faptului că posedă cea mai mică presiune osmotică, solubilitatea și viscozitatea cea mai scăzută.

Comportarea proteinelor la punctul izoelectric poate fi intuită corect dacă se acceptă concepția după care atît aminoacizii cît și proteinele se găsesc la punctul izoelectric în stare de amfioni (5):

$$NH_2—\underset{\displaystyle R}{\underset{|}{CH}}—COOH \rightleftarrows {}^{+}H_3N—\underset{\displaystyle R}{\underset{|}{CH}}—COO^{-}. \qquad (5)$$

amfion

Principiul metodei. Proteina în soluție tampon cu un *p*H corespunzător punctului său izoelectric pierde sarcina electrică, devine neutră și instabilă și precipită. Prin adăugarea de alcool etilic, acetonă etc. se favorizează precipitarea proteinei.

Reactivi necesari: 1) Acid acetic, soluție *N*, din care se prepară soluții *N*/10 și *N*/100 în momentul utilizării; 2) Cazeină, soluție 0,4%, preparată în soluție de acetat de sodiu 0,1 *M*·0,2 g de cazeină uscată se dizolvă în 5 ml de soluție *M* de acetat de sodiu (13,6 g de $CH_3COONa \cdot 3H_2O$ se dizolvă în 100 ml apă distilată). Dizolvarea completă a cazeinei se realizează prin încălzirea ușoară a soluției pe o baie de apă. Soluția opalescentă astfel obținută se completează la 50 ml cu apă distilată.

Modul de lucru. În eprubete diferite se pregătesc amestecurile tampon, — soluție de acid acetic de diferite normalități și soluție de acetat de sodiu care conține și cazeină —, în proporția de volume indicată în tabela 2.

Tabela 2

Solubilitatea cazeinei la diferite valori ale *p*H-ului și determinarea punctului izoelectric al acesteia

Reactivi (ml)	Eprubeta								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Acid acetic, soluție *N*/100	0,62	1,25	—	—	—	—	—	—	—
Acid acetic, soluție *N*/10	—	—	0,25	0,50	1,00	2,00	4,00	8,00	—
Acid acetic, soluție *N*	—	—	—	—	—	—	—	—	1,60
Apă distilată	8,38	7,75	8,75	8,50	8,00	7,00	5,00	1,00	7,40
Soluție de cazeină 0,4% preparată în soluție tampon de acid acetic-acetat de sodiu	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
*p*H final al amestecului	5,90	5,60	5,30	5,00	4,70	4,40	4,10	3,80	3,50

Conținutul eprubetelor după adăugarea soluțiilor se agită energic. În toate eprubetele apare o ușoară opalescență, iar după 5—10 minute, un precipitat. Cantitatea cea mai mare de precipitat poate fi observată într-o singură eprubetă în care *p*H-ul soluției corespunde valoric punctului izoelectric al cazeinei.

Cazeina precipită în punctul izoelectric, fără a fi necesară prezența în soluție a unor cantități mici de substanțe deshidratante (alcool etilic, acetonă, tanin etc.). În cazul determinării p_i al albuminei și gelatinei, prezența acestora în mediul de reacție este însă absolut necesară.

Folosindu-se ca soluții tampon amestecul de acid acetic — acetat de sodiu, *p*H-ul amestecului se calculează după formula (6):

$$pH = pK + \lg \frac{[sarea\ (ml)]}{[acid\ (ml)]}, \qquad (6)$$

unde: *pK* este constanta de disociere a acidului (v. tabela 3). De exemplu, valoarea *pK* pentru acidul acetic este 4,75. În eprubeta 6 din tabela 2, *p*H-ul soluției este egal cu 4,45 (7):

$$4{,}75 + \lg\frac{1}{2} = 4{,}75 - \lg 2 = 4{,}75 - 0{,}3 = 4{,}45. \qquad (7)$$

Tabela 3

Constantele de disociere ale unor acizi

Denumirea acidului	Constanta de disociere
Acid lactic	$1{,}55\times10^{-4}$
Acid acetic	$1{,}86\times10^{-5}$
Acid uric	$1{,}5\times10^{-6}$
Acid carbonic	$3{,}04\times10^{-7}$
Acid fosforic	$1{,}95\times10^{-7}$
Acid boric	$6{,}6\times10^{-10}$
Acid formic	$2{,}05\times10^{-4}$
Acid salicilic	$1{,}06\times10^{-3}$

Cunoașterea punctului izoelectric al proteinelor are o importanță deosebită în practica separării preparatelor de proteine din țesuturile animale și vegetale. Punctul izoelectric este frecvent utilizat pentru separarea prin metoda salifierii a diferitelor fracții proteice obținute din același țesut.

BCU BIBLIOTECA CENTRALĂ UNIVERSITARĂ

1.3.2. REACȚII DE PRECIPITARE

Principiul metodei. Proteinele sub acțiunea factorilor chimici, fizici și fizico-chimici sînt denaturate, devenind insolubile în apă și în solvenții specifici.

După natura reactivilor folosiți pentru precipitarea proteinelor deosebim trei categorii diferite de agenți de precipitare:

— *solvenți organici* (alcool, eter, cloroform etc.);

— *acizi minerali și organici* (acizii azotic, molibdenic, wolframic, tricloracetic, sulfosalicilic, picric etc.);

— *săruri ale metalelor grele* (acetatul de uranil, acetatul de plumb, sulfatul de zinc, sulfatul de cupru ș.a.m.d.). Condițiile optime pentru precipitarea proteinelor cu ajutorul sărurilor metalelor grele se realizează printr-o ușoară alcalinizare a mediului de reacție.

Reactivi necesari: 1) Cazeină, soluție 1%; 2) Proteine, soluție alcalină; 3) Albumină, soluție 1%; 4) Alcool, 96%; 5) Cloroform pur; 6) Acid clorhidric, p.a.; 7) Acid tricloracetic, soluție 20%; 8) Acid picric, soluție 1%; 9) Acid sulfosalicilic, soluție 20%; 10) Acid citric, soluție 1%.

Modul de lucru. Într-o serie de eprubete se măsoară cu pipeta cîte 2 ml de soluție de proteină (cazeină, albumină sau amestec de soluție de proteine). Se adaugă apoi în fiecare eprubetă reactivul ales pentru precipitarea proteinei (v. tabela 4).

Tabela 4

Precipitarea proteinelor

Reactivi (ml)	Eprubeta					
	1	2	3	4	5[1]	6
Soluție de proteină	2	2	2	2	2	2
Alcool, 96%	1	—	—	—	—	—
Cloroform, pur	—	1	—	—	—	—
Acid clorhidric, concentrat	—	—	1	—	—	—
Acid tricloracetic, soluție 20%	—	—	—	0,5	—	—
Acid picric, soluție 1%	—	—	—	—	2	—
Acid sulfosalicilic, soluție 20%	—	—	—	—	—	0,4

[1] În prezența acidului citric, 2 ml de soluție 1%, adăugat ulterior se formează un precipitat colorat în galben-portocaliu.

În toate eprubetele, după 3—5 minute de la adăugarea reactivilor, se observă apariția unui precipitat de culoare albă.

Reacțiile de precipitare a proteinelor sînt curent folosite în practica de laborator pentru separarea proteinelor din extractele și lichidele biologice în care urmează să se dozeze alți componenți, de exemplu, zaharurile

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

reducătoare, amidonul, produșii finali ai metabolismului proteic, elementele minerale etc.

Precipitarea proteinelor cu ajutorul reactivilor chimici (acizi minerali și organici în soluții concentrate) sau sub acțiunea factorilor fizici, de exemplu, prin încălzire, este un proces ireversibil.

1.3.2.1. Tehnica de deproteinizare a diferitelor lichide biologice (sînge, plasmă, urină, extracte tisulare etc.)

1.3.2.2. Precipitarea proteinelor după Bergmann și Dikstein

Principiul. Proteinele în prezența acidului percloric și la temperaturi ridicate coagulează, precipitînd din soluție.

Reactivi necesari: 1) Acid percloric, soluție 6%; 2) Clorură mercurică, soluție 10% preparată în soluție 0,1 *N* de HCl; 3) Clorură mercurică, soluție 1% preparată în soluție 0,1 *N* de HCl; 4) Hidrogen sulfurat, gaz.

Modul de lucru

Varianta pentru sînge. Sîngele care se recoltează în prezența heparinei sau a citratului de sodiu (utilizarea oxalatului de amoniu fiind contraindicată) este centrifugat timp de 10 minute la 4 000—5 000 turații/minut și plasma obținută este diluată de 6 ori cu apă distilată. La 10 ml de acid percloric, soluție 6% se adaugă, picătură cu picătură, 10 ml de plasmă diluată și amestecul se agită energic după fiecare picătură de plasmă adăugată. Probele sînt introduse pentru 5 minute într-o baie de apă, la temperatura de 60°C. Proteinele sedimentează sub forma unui precipitat alb, care este ulterior separat prin filtrare.

Se recomandă, de asemenea, utilizarea plasmei diluate în prealabil cu soluție de HCl 0,1*N*. 1 ml de plasmă este diluat cu 9 ml de soluție de HCl 0,1*N*. La plasma astfel diluată se adaugă, picătură cu picătură și agitîndu-se continuu, 2 ml de clorură mercurică, soluție 10% și probele se introduc pentru 5 minute într-o baie de apă în clocot.

După 5 minute probele (indiferent de modul de tratare a plasmei sanguine) sînt răcite într-un curent de apă (la robinet) și precipitatul este separat prin filtrare. Filtrul este spălat de 2 ori cu cîte 1,5 ml de clorură mercurică, soluție 1%, preparată în soluție de HCl 0,1*N*. Filtratul obținut, care conține și apele de spălare, este saturat cu hidrogen sulfurat (prin barbotarea soluției cu H_2S, timp de 20 de minute[1]. Sulfura mercurică, formată în timpul barbotării, este îndepărtată prin filtrare. Filtrul este spălat de 2 ori cu cîte 2 ml de soluție fierbinte de HCl 0,1*N*, iar filratul rezultat este încălzit la fierbere timp de 5 minute pentru îndepărtarea excesului de hidrogen sulfurat.

[1] Operațiile următoare se efectuează sub nișă.

Varianta pentru urină patologică. Urina patologică care conține proteine este tratată după diluarea de 5 ori (cu apă distilată) cu un volum egal de soluție de acid percloric și amestecul este filtrat. Filtratul este diluat de 5 ori cu soluție de acid percloric 6%. Diluția finală a urinei defecate s-a făcut în proporție de 1 : 50.

Tehnica descrisă de Bergmann și Dikstein este utilizată cu succes pentru obținerea filtratelor în care urmează să se dozeze, în special, acidul uric.

1.3.2.3. Precipitarea proteinelor după Folin

Reactivi necesari: 1) Sulfat de sodiu — wolframat de sodiu, soluție. Se dizolvă separat în apă distilată 6 g de wolframat de sodiu și 15 g de sulfat de sodiu anhidru. Soluția de Na_2SO_4 (aproximativ 250—300 ml) trebuie să fie neutră, iar cea de Na_2WO_4 — alcalină față de fenolftaleină — utilizată ca indicator. Ulterior cele două soluții sînt amestecate într-un balon cotat de 1 l și volumul este adus la semn cu apă distilată; 2) Acid sulfuric, soluție 1/3 *N*. La 1 volum de soluție de acid sulfuric 0,1 *N* se adaugă 2 volume de apă distilată.

Modul de lucru. Într-un balon Erlenmeyer se introduc 8 volume de soluție Na_2WO_4 — Na_2SO_4 la care se adaugă un volum de sînge proaspăt, recoltat pe oxalat de sodiu. Amestecul se agită cu atenție, evitîndu-se formarea de emulsii și se lasă în repaus timp de 5—10 minute.

Se adaugă apoi la amestec cu pipeta un volum egal de soluție H_2SO_4 1/3*N* și se agită din nou timp de 1 minut, după care se centrifughează sau filtrează. Filtratul obținut trebuie să fie perfect clar. Un ml de filtrat, în cazul cînd se folosesc inițial 5 ml de sînge, corespunde la 0,1 ml de sînge total.

1.3.2.4. Precipitarea proteinelor după Hagedron-Jensen

Reactivi necesari: 1) Sulfat de zinc, soluție 45%. Din această soluție la fiecare 8 zile se prepară o soluție de lucru $ZnSO_4$ 0,45%, care se folosește pentru precipitarea proteinelor; 2) Hidroxid de sodiu, soluție 0,1 *N*.

Modul de lucru. Într-o serie de eprubete obișnuite se adaugă cu pipeta cîte 5 ml soluție de $ZnSO_4$ 0,45% și 1 ml soluție de NaOH 0,1*N* și conținutul eprubetelor se agită ușor. La amestecul, care prezintă o ușoară floculație, se adaugă dintr-o micropipetă 0,1 ml de sînge, evitîndu-se agitarea întregului volum de soluție a agentului precipitant. Micropipeta se spală de 2—3 ori cu amestecul soluțiilor de $ZnSO_4$ și NaOH, iar apele de spălare a micropipetei sînt colectate în aceeași eprubetă. Conținutul eprubetelor se agită ușor și proba este introdusă pentru 3 minute într-o baie de apă în clocot.

Se prepară o serie de eprubete Hagedorn curate și uscate, precum și filtre de hîrtie spălate anterior, de 2—3 ori, cu cîte 10 ml de apă distilată fierbinte.

După 3 minute probele sînt scoase din baia de apă și conținutul fiecăreia este filtrat în eprubeta Hagedorn corespunzătoare. Eprubetele în care au fost precipitate proteinele sînt spălate de 2 ori cu cîte 3 ml de apă distilată fierbinte și apele de spălare sînt filtrate în eprubetele Hagedorn.

Întreaga cantitate de filtrat, care conține și apele de spălare, corespunde la 0,1 ml de sînge. Eșantioanele de sînge astfel deproteinizate sînt utilizate în mod curent pentru dozarea cantitativă a zaharurilor reducătoare.

În literatură există o modificare a tehnicii Hagedorn-Jensen pentru precipitarea proteinelor, descrisă de Kowarski și Klopschtok, pentru obținerea filtratelor în care urmează să se dozeze azotul restant. Autorii precipită proteinele prezente în 0,25 ml de sînge, folosind aceiași reactivi și păstrînd proporțiile dintre ei, iar filtrarea se face într-un balon Kyeldahl cu o capacitate de 50—100 ml.

1.3.2.5. Precipitarea proteinelor după Fujita și Iwatake

Reactivi necesari: 1) Sulfat de cadmiu, soluție. Se dizolvă 13 g de $CdSO_4$ în prezența a 63,5 ml soluție de H_2SO_4 *N* și volumul se aduce la 1 l cu apă distilată; 2) Hidroxid de sodiu, soluție 1,1 *N*.

Modul de lucru. Pentru fiecare mililitru de sînge, în care urmează să se precipite proteinele, se adaugă cu pipeta într-o eprubetă 8 ml de soluție de $CdSO_4$ și 1 ml de soluție NaOH 1,1*N*. Se agită timp de 1 minut. Proba este centrifugată și supernatantul din eprubeta de centrifugă este filtrat. Un ml de filtrat corespunde la 0,1 ml de sînge total.

Filtratul obținut după tehnica Fujita-Iwatake este frecvent folosit în practica de laborator pentru dozarea zaharurilor reducătoare.

În comparație cu alte tehnici (Folin, Hagedorn-Jensen, Somogyi), tehnica Fujita-Iwatake permite obținerea de rezultate experimentale mai apropiate de realitate în cazul dozării în filtrate a zaharurilor reducătoare. Numeroase substanțe reducătoare prezente în sînge, de exemplu, creatina, creatinina, glutationul, acidul uric etc., sînt precipitate, tehnica permițînd evitarea eventualelor erori experimentale.

1.3.2.6. Precipitarea proteinelor după Somogyi

Reactivi necesari: 1) Sulfat de zinc, soluție. Se dizolvă 12,5 g de $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ într-un litru de apă distilată, în care se adaugă în prealabil 125 ml de soluție de H_2SO_4 0,25 *N*; 2) Hidroxid de sodiu, soluție 0,75 *N*. Soluțiile (1) și (2) trebuie astfel preparate încît pentru titrarea a 50 ml de soluție de $ZnSO_4$ (1) să se consume 6,7—6,8 ml de soluție de NaOH 0,75 *N*. Titrarea se realizează în prezența fenolftaleinei, ca indicator, pînă la obținerea unei colorații roze permanente.

Modul de lucru. Precipitarea proteinelor sanguine se efectuează adăugînd cu pipeta la 1 ml de sînge total 8 ml de soluție de $ZnSO_4$ și 1 ml

de soluție de NaOH 0,75*N*. După filtrare sau centrifugare, 1 ml de filtrat corespunde la 0,1 ml de sînge total.

Tehnica Somogyi pentru obținerea filtratelor deproteinizate permite precipitarea glutationului, tioneinei, acidului uric și a altor substanțe ce conțin azot și care pot influența negativ asupra rezultatelor experimentale în cazul dozării zaharurilor reducătoare. Această tehnică este frecvent folosită pentru cercetarea cazurilor patologice, cînd cantitatea zaharurilor reducătoare în sînge este foarte crescută.

1.3.2.7. Precipitarea proteinelor după Benedict

Reactivi necesari: 1) Wolframat de sodiu, soluție. Se iau 10 g de acid molibdenic care nu conține amoniac și în prezența a 50 ml de soluție de NaOH sînt încălzite la fierbere timp de 5 minute. Soluția obținută se răcește într-un curent de apă (la robinet), se filtrează și filtrul se spală cu 150 ml de apă distilată. La filtratul obținut se adaugă 80 g de Na_2WO_4, dizolvat în prealabil în 600 ml de apă distilată și volumul soluției se aduce la 1 l cu apă distilată; 2) Acid sulfuric, soluție 0,62 *N*. Într-un recipient cotat se iau 620 ml de H_2SO_4, soluție normală, și volumul se aduce la 1 l cu apă distilată.

Modul de lucru

Precipitarea proteinelor din sîngele total. Un ml de sînge se diluează cu 7 ml de apă distilată. Se adaugă cu pipeta apoi 1 ml soluție de acid wolframo-molibdenic (soluția 1) și 1 ml de soluție de H_2SO_4 0,62*N*. Precipitatul este separat prin filtrare.

Precipitarea proteinelor din serul sanguin se realizează adăugîndu-se la 1 ml de ser 8 ml de apă distilată, iar după agitare, cîte 0,5 ml din soluțiile (1) și (2). În final, se filtrează. Fiecare mililitru de filtrat corespunde la 0,1 ml de ser sanguin inițial.

Precipitarea proteinelor după Benedict permite păstrarea în soluția de analizat a compușilor azotați cu greutate moleculară mică. Îndeosebi, ergotioneina, care este precipitată după tehnica Folin, în acest caz rămîne în soluția-filtrat.

1.3.2.8. Precipitarea proteinelor tisulare după Roe și Rice

Reactivi necesari: 1) Sulfat de zinc, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, soluție 5%; 2) Hidroxid de bariu, soluție 0,3 *N*. Soluțiile (1) și (2) trebuie să corespundă, în cazul titrării în prezența fenolftaleinei, volum la volum.

Modul de lucru. 0,5 g de țesut muscular sînt mojarate în prezența a 15 ml de apă distilată pînă la obținerea unui omogenat fin. Se adaugă cu pipeta 2 volume de soluție de $Ba(OH)_2$ 0,3*N* și se amestecă cu grijă. Se adaugă apoi 2 volume de soluție de $ZnSO_4$ 5% și amestecul se agită energic și atent, după care se filtrează.

Tehnica Roe și Rice este utilizată curent pentru obținerea filtratelor din omogenatele tisulare în care urmează să se dozeze pentozele (arabinoza, xiloza, riboza etc.).

1.3.3. SEPARAREA FRACȚIILOR PROTEICE PRIN METODA SALIFIERII

Principiul metodei. Proteinele sînt precipitate din soluție cu ajutorul sărurilor metalelor alcaline și alcalino-pămîntoase: NaCl; $(NH_4)_2SO_4$; NH_4Cl; Na_2SO_4 și $MgSO_4$. Salifierea (precipitarea proteinelor) este condiționată de deshidratarea particulelor coloidale ale proteinei și de neutralizarea concomitentă a sarcinilor electrice ale acesteia.

Reactivi necesari: 1) Sulfat de amoniu, soluție saturată; 2) Sulfat de amoniu (în pudră), preparat; 3) Proteină, soluție salină obținută din albușul de ou.

Modul de lucru

1.3.3.1. Precipitarea globulinelor

Se adaugă cu pipeta într-o eprubetă 10 ml de soluție salină de proteine și un volum egal de soluție saturată de sulfat de amoniu, obținîndu-se astfel o soluție semisaturată de $(NH_4)_2SO_4$. Globulinele, care au o greutate moleculară mai mare decît a albuminelor, precipită în decursul primelor 2—3 minute. După 5 minute soluția se filtrează, globulinele fiind reținute pe filtru.

1.3.3.2. Precipitarea albuminelor

La filtratul obținut după îndepărtarea globulinelor se adaugă sulfat de amoniu (preparat), pînă în momentul cînd se obține o soluție saturată (sulfatul de amoniu nu se mai dizolvă). „Precipitatul" de albumine care se formează poate fi observat, în acest caz, la suprafața lichidului din eprubetă (soluția are o greutate specifică mai mare decît albuminele).

În continuare, în eprubeta care conține precipitatul de albumine se adaugă un volum egal de apă distilată și se agită ușor. Se poate observa redizolvarea precipitatului. Se efectuează aceeași operație și cu precipitatul globulinelor, care este reluat cantitativ de pe filtru cu ajutorul unui jet de apă distilată.

Spre deosebire de reacțiile de precipitare a proteinelor, descrise anterior, precipitarea prin metoda salifierii nu modifică ireversibil proprietățile fizico-chimice și biologice ale proteinelor. Proteinele își păstrează proprietățile imunologice, antigene și își mențin activitatea enzimatică sau hormonală în cazul cînd acestea erau caracteristice pentru proteinele respective.

Metoda salifierii este utilizată cu succes pentru separarea fracțiilor proteice în tehnologia obținerii preparatelor hormonale și enzimatice, precum și pentru prepararea proteinelor în stare cristalizată.

Reactivul frecvent folosit pentru salifierea proteinelor este sulfatul de amoniu. În unele cazuri, pentru precipitarea globulinelor se folosesc cloruri și sulfați de sodiu sau de amoniu, ceea ce necesită însă saturarea soluției, iar pentru precipitarea albuminelor, — concomitent cu saturarea soluției cu reactivul utilizat — se impune și crearea unei reacții ușor acide a mediului.

1.4. REACȚII CALITATIVE SPECIFICE PENTRU PROTEINE

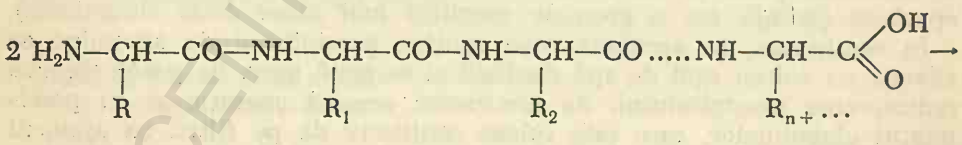
1.4.1. IDENTIFICAREA PROTEINELOR ÎN LICHIDELE BIOLOGICE ȘI PREPARATELE BIOCHIMICE

1.4.1.1. Reacția biuretului (reacția Piotrowski)

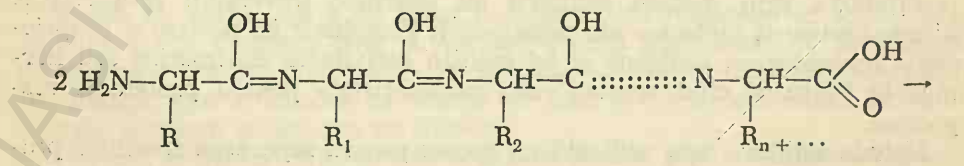
Principiul reacției. În prezența sulfatului de cupru, în mediu puternic alcalin, soluția oricărei proteine se colorează în roșu-violet sau în albastru-violet. Reacția este condiționată de prezența în structura proteinei a legăturilor peptidice, —CO—NH—, și poartă denumirea de reacția biuretului, deoarece este pozitivă și pentru compusul organic cunoscut sub numele de biuret (1):

$$H_2N—CO—NH—CO—NH_2 \qquad (1)$$

Reacția biuretului poate fi reprezentată schematic astfel (2):

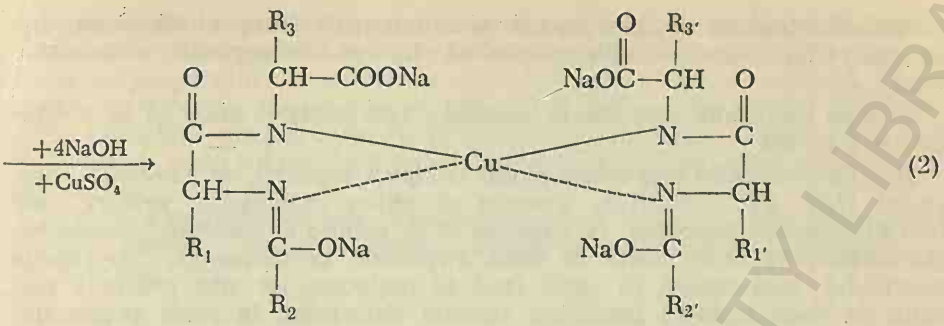


Moleculă proteică



Forma tautomeră a moleculei proteice.

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

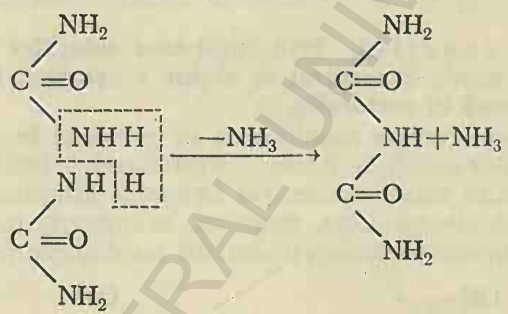


Proteinat de cupru, complex de culoare roșie-violetă.

Reactivi necesari: 1) Uree — 0,2 g (în pudră); 2) Cazeină, soluție 1%; 3) Peptonă, soluție 1%; 4) Hidroxid de sodiu, soluție 10%; 5) Sulfat de cupru, soluție 2%.

Modul de lucru:

— În două eprubete (*1* și *2*), perfect uscate, se cîntăresc aproximativ 0,2 g de uree. Una dintre eprubete (*1*) se încălzește la flacăra unui bec de gaz[1]. Are loc următoarea reacție (3):



Conținutul ambelor eprubete (*1* și *2*) se dizolvă în apă. Se adaugă în fiecare probă cîte 10 picături de soluție de NaOH 10% și 5 picături de soluție de $CuSO_4$ 2%. În eprubeta cu uree, care a fost încălzită (*1*), se obține o colorație roșie; conținutul eprubetei cu uree neîncălzită (*2*) nu dă reacția biuretului, fiind colorat în albastru datorită prezenței în soluție a $CuSO_4$.

— Se iau două eprubete uscate. În prima se adaugă cu pipeta 3 ml soluție de proteină diluată (cazeină 1%), în cea de-a doua eprubetă, 2 ml de peptonă. În ambele eprubete se adaugă 1 ml de soluție de NaOH 10% și 5 picături de soluție de $CuSO_4$ 2%. Se recomandă evitarea excesului de $CuSO_4$, care poate masca reacția biuretului datorită formării hidroxidului cupric $Cu(OH)_2$.

[1] Operația se efectuează sub nișă, deoarece prin încălzirea ureei și formarea biuretului se degajă amoniac.

BCU CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Ambele eprubete se agită energic și se compară. În eprubeta cu cazeină se observă o coloraţie albastră-violetă, în cea cu peptonă, o coloraţie roză.

Reacţia biuretului este foarte sensibilă, este pozitivă chiar și la o diluţie de 1/10 000.

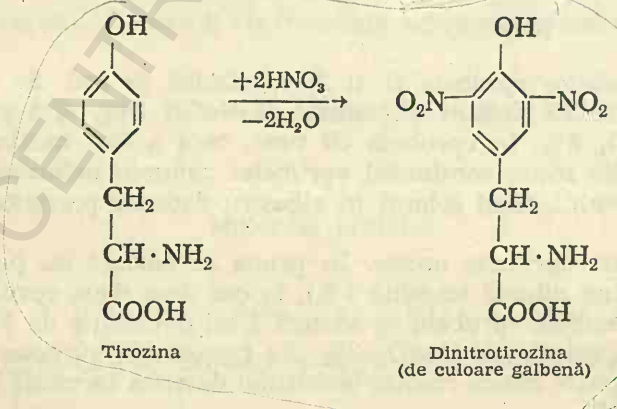
Reacţia biuretului o prezintă și alţi compuși organici, de exemplu, compusul $H_2N—CO—CO—NH_2$, *precum și cîţiva aminoacizi, printre care histidina, serina, treonina, cu condiţia ca în soluţia de analizat, concentraţia acestora să fie suficient de mare.* Peptidele, de asemenea, dau reacţia biuretului, însă numai în cazul cînd în molecula lor sînt prezente mai mult de două legături peptidice. Reacţia biuretului, în cazul peptonelor și polipeptidelor, are o tentă roșie pronunţată.

1.4.2. METODE DE IDENTIFICARE A AMINOACIZILOR CICLICI ÎN HIDROLIZATELE PROTEICE

1.4.2.1. Reacţia xantoproteică (reacţia Mulder)

Principiul reacţiei. Prin încălzirea soluţiilor de proteină în prezenţa acidului azotic concentrat se obţine o coloraţie galbenă, care în mediul alcalin virează în portocaliu.

Reacţia xantoproteică este condiţionată de prezenţa în molecula proteinelor a aminoacizilor ciclici — tirozina, triptofanul și fenilalanina, — care sub acţiunea acidului azotic concentrat formează nitroderivaţi de culoare galbenă (1). Proteinele (gelatina, clupeina, salmonina) în compoziţia cărora nu intră aminoacizii enumeraţi mai sus nu dau reacţia xantoproteică.



(1)

Reactivi necesari: În două eprubete se adaugă cu pipeta 0,5 ml soluţie de analizat: în prima, 0,5 ml de cazeină, în a doua, 0,5 ml de gelatină. În ambele eprubete se adaugă 2—3 picături de acid azotic concentrat și conţinutul eprubetelor se încălzește la flacăra unui bec de gaz.

BCU IAȘI / CENTRUL UNIVERSITAR LIBRARY

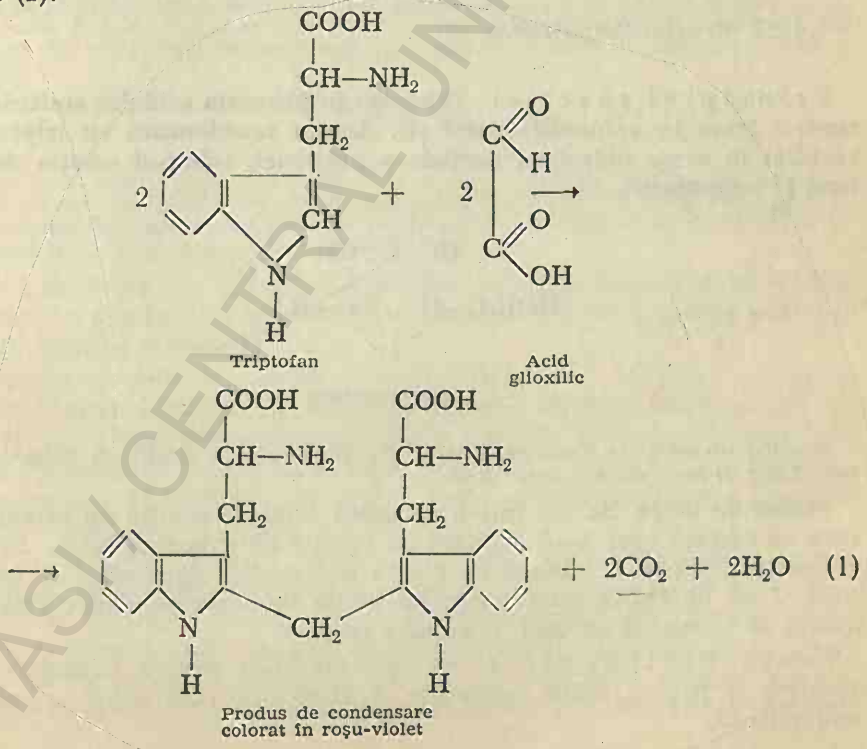
În eprubeta cu cazeină apare o coloraţie galbenă, iar în cea cu gelatină, o coloraţie galbenă-deschis, aproape imperceptibilă, condiţionată de prezenţa în preparatul de gelatină a impurităţilor de natură proteică. După răcire în eprubeta cu cazeină se adaugă 10 picături de soluţie de NaOH 30%. Coloraţia soluţiei trece de la galben la portocaliu. Nuanţa coloraţiei în eprubeta care conţine gelatină nu se schimbă după adăugarea soluţiei de NaOH.

Reacţia xantoproteică este pozitivă şi poate fi observată uşor şi în cazul acţiunii acidului azotic concentrat asupra pielii, fanerelor, lînii şi confecţiilor din lînă.

1.4.2.2. Reacţia Adamkiewicz în modificaţia Hopkins şi Cole

Principiul reacţiei. **Proteinele în prezenţa acizilor glioxilic** ($H-C(=O)-C(=O)-OH$) **şi sulfuric concentrat dau o coloraţie roşie-violetă, condiţionată de prezenţa în molecula lor a triptofanului.**

Acidul sulfuric concentrat produce o uşoară hidroliză a proteinei cu eliberare de triptofan. Reacţia acestuia cu acidul glioxilic are loc după ecuaţia (1):



Reactivi necesari: 1) Cazeină, soluție 1%; 2) Acid glioxilic; 3) Acid sulfuric concentrat; 4) Triptofan, soluție 1%.

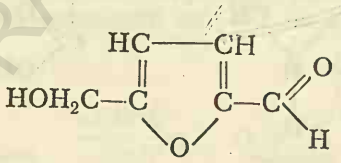
Modul de lucru. Într-o eprubetă măsurăm cu pipeta 2 ml de soluție de cazeină 1% și 10 picături de acid glioxilic, după care pe peretele eprubetei se adaugă atent dintr-o pipetă 2 ml de H_2SO_4 concentrat. La limita de separare dintre cele două soluții — acid sulfuric și cazeină — se formează un inel de culoare roșie-violetă. Se va proceda identic cu o soluție de triptofan 1%. Rezultatele se vor compara.

Reacția Adamkiewicz în modificația Hopkins-Cole este pozitivă și pentru derivații indolului. Deoarece aceștia nu sînt prezenți în hidrolizatele proteice, reacția poate fi utilizată cu succes pentru identificarea triptofanului.

În cazul cînd acidul glioxilic nu poate fi preparat în laborator, Schultz recomandă utilizarea acidului acetic glacial (se adaugă la soluția proteinei cercetate 3 ml de CH_3COOH glacial, se încălzește ușor și se adaugă H_2SO_4 concentrat), care conține urme de acid glioxilic.

1.4.2.3. Reacția Pettenkoffer

Principiul reacției. Zaharoza în prezența acidului sulfuric concentrat trece în oximetilfurfurol (1). Acesta reacționează cu triptofanul, rezultat în urma hidrolizei parțiale a proteinei, colorînd soluția de analizat în roșu-aprins.



(1)

Oximetilfurfurol

Reactivi necesari: 1) Proteină, soluție 1%, preparată în alcalii; 2) Zaharoză, soluție 2,5%; 3) Acid sulfuric concentrat.

Modul de lucru. Se iau într-o eprubetă 2 ml de soluție de proteină, la care se adaugă apoi 1—2 picături de soluție de zaharoză 2,5%. Se agită și foarte prudent se adaugă cu pipeta pe peretele eprubetei, în porțiuni mici, 2 ml de H_2SO_4 concentrat. La limita de separare dintre cele două soluții se formează un inel de culoare roșie.

Reacția Pettenkoffer nu este specifică pentru triptofan, fiind pozitivă și pentru acizii taurocolic și glicocolic, însă avînd o colorație mai intensă.

BCU CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

1.4.2.4. Reacția Millon

Principiul reacției. Prin încălzirea soluțiilor de proteine cu reactivul Millon se formează un precipitat proteic, colorat în roșu. Reacția este condiționată de prezența în compoziția proteinelor a aminoacidului ciclic tirozina, care cu reactivul Millon formează sarea mercurică a nitroderivatului acestuia, colorată în roșu.

Reactivi necesari: 1) Cazeină, soluție 1%; 2) Peptonă, soluție 1%; 3) Tirozină, soluție 1%; 4) Fenol, soluție 0,5% în apă; 5) Reactivul Millon. Pentru prepararea acestui reactiv, 100 g mercur sînt dizolvate în 143 ml acid azotic concentrat (d=1,4). După agitarea energică a soluției (pentru dizolvarea completă a mercurului), se recomandă încălzirea pe o baie de apă. La soluția astfel obținută se adaugă 2 volume de apă distilată și 1—3 ml de azotit de sodiu, soluție 1% și amestecul se agită din nou. După cîtva timp, reactivul este decantat și păstrat în flacoane bine închise.

În practica de laborator se utilizează frecvent reactivul preparat după următoarea rețetă: se amestecă 2 ml de soluție de $HgSO_4$ 5%, preparată în soluție de H_2SO_4 5%, cu 1—2 picături de soluție de azotit de sodiu 1%. Reactivii menționați se conservă separat și numai în momentul utilizării se prepară amestecul lor; 6) Acid sulfuric, soluție 5%. Pentru prepararea soluțiilor procentuale ale acizilor minerali este necesar să se cunoască densitatea acidului și conținutul în g într-un ml de soluție concentrată de acid. Dacă se prepară o soluție de H_2SO_4 5% din acid sulfuric concentrat, (d=1,84), 100 g de soluție din acest acid conțin 95 g de acid sulfuric și, prin urmare, 5 g de H_2SO_4 se vor găsi în 5,26 g soluție de H_2SO_4 concentrat. Se calculează în ce volum de acid sulfuric concentrat (d=1,84) se găsesc 5,26 g de H_2SO_4:

$$\frac{5{,}26\ g}{1{,}84} = 2{,}85\ ml.$$

Pentru prepararea soluției de H_2SO_4 5%, într-o capsulă de porțelan se iau exact 97,15 ml de apă distilată și se adaugă dintr-o microbiuretă 2,85 ml de H_2SO_4 concentrat, conținutul capsulei agitîndu-se permanent cu o baghetă de sticlă (prepararea soluției în baloane cotate este contraindicată).

Modul de lucru. Se iau patru eprubete, se numerotează și în fiecare se adaugă cu pipeta 1 ml din soluțiile ce urmează să fie analizate (cazeină, peptonă, tirozină și fenol).

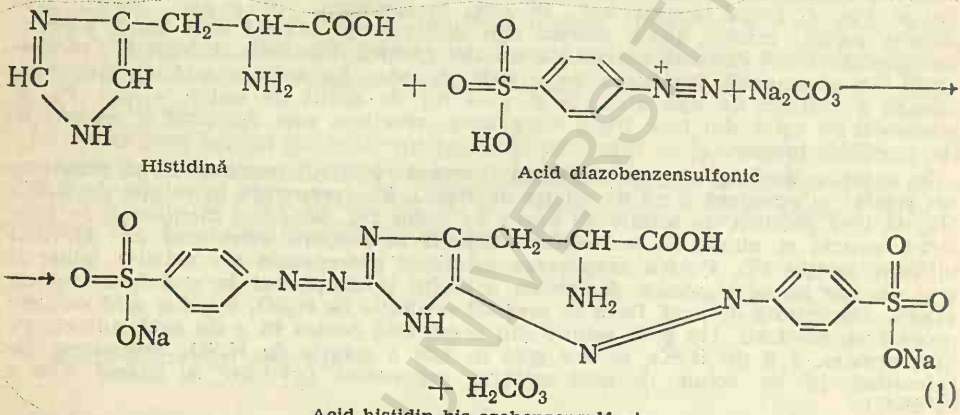
În fiecare eprubetă se adaugă 5 picături de reactiv Millon proaspăt preparat. După încălzire în eprubete se pot observa următoarele: în eprubeta cu soluția proteinei (cazeina) se constată o colorație roșie-cărămizie a coagulatului format, lichidul supernatant necolorîndu-se; în eprubeta cu soluția de peptonă, tirozină și fenol se observă absența oricărui coagulat și colorarea integrală a soluției.

Nasse *a demonstrat că reacția* Millon *nu este specifică pentru tirozină, ea fiind pozitivă și pentru compușii aromatici care au o grupare hidroxil,* de exemplu, fenoli, polifenoli, acid salicilic etc. Deoarece substanțele menționate mai sus sînt practic absente în molecula proteinelor, reacția Millon este folosită curent și cu rezultate pozitive pentru identificarea tirozinei în preparatele proteinelor și în hidrolizatele proteice.

1.4.2.5. Reacţia Pauli

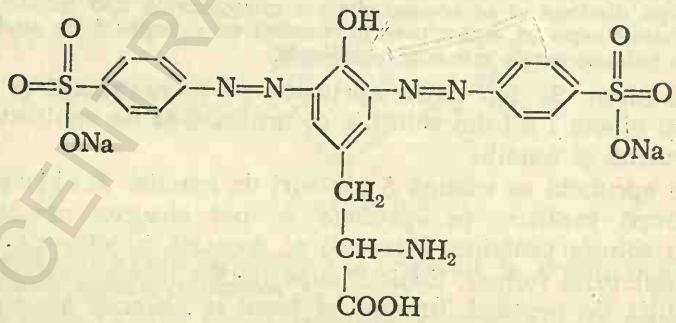
Principiul reacţiei. Proteinele în compoziţia cărora intră histidina şi tirozina (sau numai unul dintre aceşti aminoacizi) în mediu alcalin dau o coloraţie roşie-oranj în prezenţa acidului diazobenzensulfonic.

Pauli presupune că reacţia care are loc poate fi reprezentată schematic astfel (1):



(1)

Tirozina reacţionează după aceeaşi schemă cu azocoloranţii, formînd un derivat cu următoarea configuraţie (2):



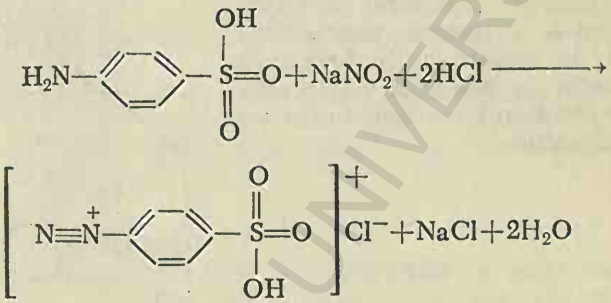
(2)

Histidina se găseşte în cantităţi apreciabile în proteinele de origină animală şi vegetală în cantităţi ce variază în funcţie de natura proteinei de analizat. Astfel, în hemoglobină, histidina formează 7,6%, în tireoglobulină, 3,0%, în proteinele din ser, laptele de vacă, în făina de soia, în boabele de grîu şi de porumb, cantitatea acestui aminoacid variază între 2 şi 2,5%.

BCU Iaşi / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Reactivi necesari: 1) Cazeină, soluție 1%; 2) Carbonat de sodiu, soluție 10%; 3) Acid sulfanilic, soluție 1%, preparat în soluție de HCl 2%. Prepararea soluției de HCl 2%: dacă se utilizează preparatul de acid clorhidric concentrat care conține în 100 g de soluție de HCl 37 g HCl (d=1,19), atunci 2 g de acid clorhidric se vor găsi în 5,4 ml HCl concentrat. Pentru prepararea soluției de HCl 2% se vor utiliza $\frac{5,4}{1,9}$=4,5 ml, care vor fi adăugați la 95,5 ml de apă distilată într-o capsulă de porțelan, avînd grijă să se amestece conținutul capsulei, cu multă prudență, cu o baghetă de sticlă. Se recomandă prepararea soluției sub nișă și evitarea adăugării cu pipeta a HCl; 4) Azotit de sodiu, soluție 5%; 5) Prepararea acidului diazobenzensulfonic. Deoarece acidul diazobenzensulfonic este un compus organic care prin păstrare se descompune, pentru reacția Pauli se recomandă să fie proaspăt preparat. În acest scop se amestecă la 0°C și sub agitare energică 1 ml de soluție de acid sulfanilic 1% preparat în soluție de HCl 2% și 1 ml de soluție de $NaNO_2$ 5%.

Reacția decurge conform ecuației (1):



(1)

Modul de lucru. Într-o eprubetă uscată se adaugă cu pipeta 2 ml de soluție de cazeină 1%, 2—4 picături de soluție de Na_2CO_3 10% și 2 ml de soluție proaspăt preparată de acid diazobenzensulfonic. Conținutul eprubetei, după o ușoară agitare, se colorează în roșu sau oranj.

Reacția Pauli este sensibilă la o concentrație a aminoacidului în mediul de reacție de 1/100 000 și poate fi adaptată pentru dozarea cantitativă a histidinei în cazul cînd soluția de cercetat (hidrolizatul de proteină) nu dă reacția Molisch (v. mai jos).

Reacția Pauli *nu este absolut specifică pentru histidină și tirozină. Substanțele organice în a căror structură intră nucleul imidazolic, pirolic și tiazolic (adrenalina, tiamina, carnozina, pigmenții biliari etc.) dau de asemenea reacția* Pauli *pozitivă.* Deoarece toate substanțele enumerate mai sus sînt practic absente în proteinele native, reacția Pauli este frecvent utilizată pentru identificarea tirozinei și histidinei în compoziția și în hidrolizatele proteinelor.

Reacția Pauli poate fi folosită și pentru dozarea tirozinei în hidrolizatele proteice, dar numai în condițiile unei precipitări prealabile a histidinei cu acetat de mercur și clorură de sodiu.

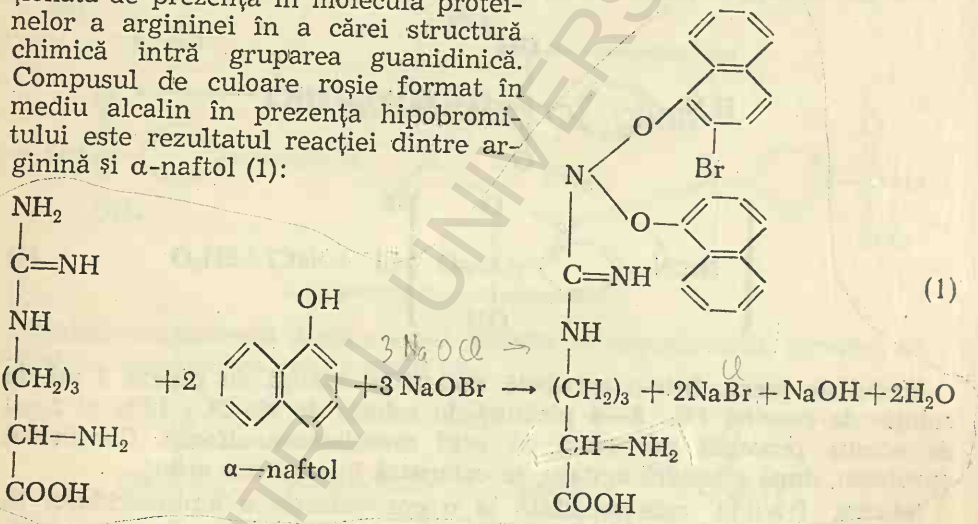
1.4.3. METODE DE IDENTIFICARE A AMINOACIZILOR ACICLICI ÎN HIDROLIZATELE PROTEINELOR

1.4.3.1. Reacţia Sakaguchi modificată de Weber

Sakaguchi pune la punct o reacţie de culoare caracteristică pentru compuşii organici ce conţin guanidină, iar Weber modifică această reacţie, adaptînd-o pentru dozarea cantitativă a argininei şi înlocuind NaClO cu hipobromit de sodiu.

Principiul reacţiei. Proteinele în mediul acalin şi în prezenţa α-naftolului şi hipobromitului de sodiu (oxidant) dau o coloraţie roşie.

Reacţia Sakaguchi este condiţionată de prezenţa în molecula proteinelor a argininei în a cărei structură chimică intră gruparea guanidinică. Compusul de culoare roşie format în mediu alcalin în prezenţa hipobromitului este rezultatul reacţiei dintre arginină şi α-naftol (1):



(1)

Arginina se găseşte în cantităţi relativ mari în compoziţia proteinelor animale şi vegetale (v. tabela 5).

Tabela 5

Conţinutul argininei (în %) în diferite proteine şi produse de origină animală şi vegetală

Proteine	Arginină (%)	Produse animale sau vegetale	Arginină (%)
Gelatină	7,6	Lapte de vacă (total)	4,3
Hemoglobină	3,5	Porumb (în bob)	4,0
Ovalbumină	5,7	Făină de soia	5,8
Insulină	3,3	Grîu (în bob)	2,8—3
Cazeină	4,1	Pîine	3,5

Reactivi necesari: 1) Cazeină, soluție 1%; 2) Hidroxid de sodiu, soluție 5%; 3) α-naftol, soluție 1% în alcool; 4) Hipobromit de sodiu, soluție 10%. La 5 ml de soluție 10% de NaOH se adaugă sub nișă și la rece 10 picături de brom. Soluția se agită energic și se folosește imediat.

Modul de lucru. La 2 ml de soluție de cazeină 1% se adaugă 1 ml de soluție de NaOH 5%, 3—4 picături de soluție de α-naftol 1% și o picătură din soluția de NaBrO 10%. Treptat soluția de analizat se colorează în roșu aprins.

Reacția este foarte sensibilă, putînd fi observată și la o diluție a argininei în soluția de analizat de 1/1 000 000 și poate fi utilizată pentru determinări cantitative, dacă în prealabil se stabilesc experimental cantitățile optime de α-naftol și de NaBrO pentru colorarea la maximum de intensitate a soluției. Excesul de hipobromit, precum și eventuala prezență în mediul de reacție a amoniacului sînt nedorite, deoarece reacția se produce greu și este parțial mascată.

Reacția Sakaguchi *este dată și de compușii organici în a căror structură chimică se întîlnește gruparea guanidinică, de exemplu, metilguanidina.*

Această reacție este frecvent utilizată pentru identificarea argininei pe cromatogramele executate pe hîrtie, cu condiția ca acestea să fie în prealabil tratate cu o soluție alcalină de α-naftol și apoi pulverizate (sub nișă) cu hipobromit de sodiu.

1.4.4. IDENTIFICAREA AMINOACIZILOR ÎN HIDROLIZATELE PROTEINELOR. METODA CROMATOGRAFIEI PE HÎRTIE

Metoda cromatografică a fost imaginată și folosită de M. S. Țvet pentru izolarea diferiților pigmenți vegetali. Începînd din 1931, cînd Kuhn și Lederer, folosind aceeași metodă, reușesc să separe carotenoizii de origină vegetală în cîteva componente cu structură chimică diferită, metoda cromatografică devine un instrument larg utilizat în laboratoarele de cercetare. După 23 de ani (1943), Consden, Gordon și Martin descriu o nouă variantă a metodei cromatografice — cromatografia pe hîrtie — mult mai comodă și mai rapidă, utilizată astăzi în mod curent în toate laboratoarele, datorită atît simplității ei cît și faptului că necesită cantități de material relativ mici, de ordinul μl. Un alt avantaj al acestei metode constă în aceea că se utilizează hîrtia cromatografică, care este omogenă, translucidă, relativ stabilă și, fiind produsă pe scară industrială, poate fi ușor standardizată.

Clasificarea metodelor cromatografice se face după diferite criterii, fapt care creează dificultăți în folosirea unei nomenclaturi corespunzătoare și unanim recunoscute. Criteriile care stau la baza clasificării metodelor cromatografice pot fi grupate după cum urmează: dimensiunile zonei inițiale a amestecului (analiza frontală), natura și geometria fazei mobile, reacția de bază dintre adsorbant și amestecul separat etc.

Pentru separarea cromatografică a aminoacizilor se utilizează cromatografia pe hîrtie.

Hîrtia cromatografică frecvent folosită în laborator este Whatman nr. 1, 2, 4; Schleicher și Schull nr. 2043-B și 2045-Mgl. De obicei, se folosește hîrtia cromatografică ca atare, fără o prelucrare specială înainte de întrebuințare. Cromatografia pe hîrtie a hidrolizatelor proteice întîmpină unele dificultăți, deoarece pe cromatograma developată apar adesea dungi, spoturi alungite, așa-numitele „comete". Pentru evitarea acestor neajunsuri, majoritatea cercetătorilor recomandă spălarea hîrtiei înainte de întrebuințare cu apă distilată, acid acetic, solvenți organici, apă acidulată etc.

Separarea substanțelor din extractele eterogene este realizată prin folosirea *hîrtiei cromatografice impregnate* sau *îmbibate* cu diferite substanțe, de exemplu, acid silicic, silicagel, vaselină, cauciuc, formamidă, propilglicol, uleiuri speciale, ulei de parafină dizolvat în eter sau în benzină etc., care măresc capacitatea de rezoluție a hîrtiei cromatografice cînd se întrebuințează un amestec de solvenți corespunzători scopului propus.

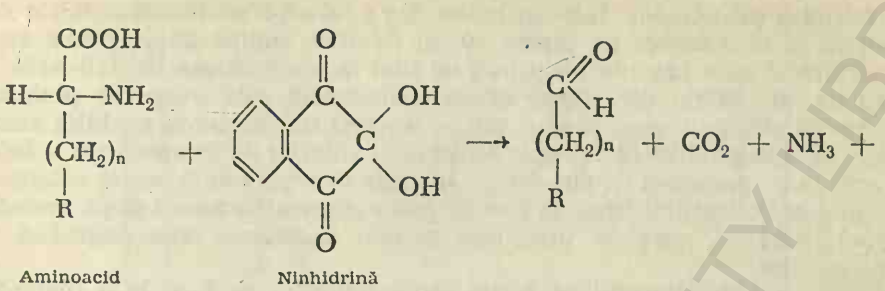
După direcția de migrare a solventului se deosebesc mai multe *tipuri de cromatografie pe hîrtie: cromatografia ascendentă,* cînd solventul migrează de jos în sus, *descendentă,* cînd direcția de migrare a solventului este inversă, de sus în jos, *radială* și *sferică* cînd se întrebuințează rondele de hîrtie cromatografică sau sfere compacte ale acesteia. Dacă solventul migrează într-o singură direcție, procedeul poartă denumirea de *cromatografie unidimensională* (ascendentă sau descendentă), iar cînd solventul migrează în două direcții diferite și perpendiculare una pe cealaltă — *cromatografie bidimensională.* Ultimul procedeu se folosește cînd în cromatografia unidimensională spoturile substanțelor supuse separării sînt suprapuse. În acest caz, cromatograma unidimensională se usucă la temperatura camerei sau în termostat și se recromatografiază cu un nou sistem de solvenți a căror direcție de migrare va fi perpendiculară pe direcția primului sistem de solvenți utilizat.

În cromatografia unidimensională se întrebuințează în mod obișnuit benzi de hîrtie cromatografică late de 1,5—20 cm și lungi de 20—25 cm, în timp ce în cromatografia bidimensională se utilizează coli întregi de hîrtie cromatografică, iar timpul necesar pentru separarea substanțelor este mai mare decît în cazul cromatografiei unidimensionale.

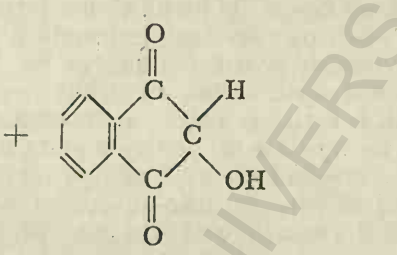
Cromatografia descendentă prezintă unele avantaje față de cea ascendentă și permite folosirea unor benzi de hîrtie deosebit de lungi, realizîndu-se astfel o separare mai completă a amestecului (extractelor) în componentele corespunzătoare.

Principiul metodei. Aminoacizii prezenți în hidrolizatul proteinei sînt separați cromatografic. Cromatogramele sînt uscate și developate prin pulverizarea lor cu soluție de ninhidrină.

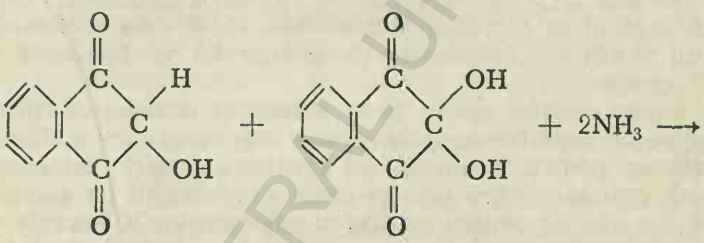
Ninhidrina reacționează cu aminoacizii după ecuațiile:

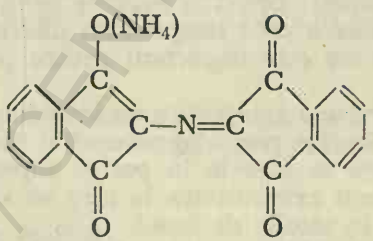


Aminoacid Ninhidrină



(1)





(2)

Reactivi necesari: 1) 0,5 g de proteină; 2) Acid clorhidric, soluție 20%; 3) Soluție de fenol, saturată cu apă. Se iau 100 g de fenol și se agită într-un recipient în prezența a 50 ml de apă distilată, după care se lasă în repaus timp de 10—15 ore. Stratul fenolic inferior este utilizat pentru cromatografia pe hîrtie; 4) Ninhidrină, soluție 0,1%, preparată în alcool absolut.

BCU CLUJ / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Modul de lucru

Hidroliza proteinelor. Într-un balon Kyeldahl se introduc 0,5 g de proteină și se măsoară cu pipeta 10 ml de HCl, soluție 20%. Proba este mineralizată pe o baie de nisip (sau de ulei la temperatura de 115—125°), timp de 20—25 de ore. După aceea hidrolizatul este evaporat pînă în momentul obținerii unui produs vîscos. Pentru îndepărtarea acidului clorhidric se adaugă 10—15 ml apă distilată și ulterior se evaporă pe o baie de apă, la temperatura de 60—70°C. Operația se repetă de 3 ori, se măsoară volumul hidrolizatului final, în care se poate determina azotul după metoda Kyeldahl și, care se utilizează pentru separarea cromatografică a aminoacizilor.

Aplicarea hidrolizatului pe hîrtia cromatografică se face la o distanță de 5 cm de marginea benzii de hîrtie (5 cm lățime și 28—30 cm lungime) și la o depărtare egală de cele două extremități paralele ale hîrtiei. Locul unde se aplică extractul poartă denumirea de *„linia de start"* și trebuie însemnat cu ajutorul unui creion cu grafit negru. Cantitatea de extract luată pentru analiză este, de obicei, neînsemnată, 2—10 μl, și se aplică în volume mici și de repetate ori pentru a evita sorbția pe o suprafață mare de hîrtie. După fiecare aplicare a substanței hîrtia cromatografică se usucă prin ușoare agitări în aer, sau într-un curent de aer cald, aplicarea ulterioară a extractului realizîndu-se din nou pe hîrtia complet uscată. Pe aceeași cromatogramă, în vecinătatea punctului în care s-a aplicat hidrolizatul, la o distanță de 3 cm, se aplică soluția unui aminoacid care se presupune a fi prezent în hidrolizatul proteinei. Pe diferite cromatograme se aplică soluții de diferiți aminoacizi. Cromatografia se efectuează în camerele cromatografice.

Camera cromatografică poate avea forme și dimensiuni diferite (figura 18). Se recomandă folosirea de camere cromatografice închise ermetic, deoarece adesea pentru obținerea de rezultate experimentale satisfăcătoare camera cromatografică este saturată în prealabil cu solventul care urmează să fie utilizat pentru separarea substanțelor. Camerele cromatografice închise ermetic prezintă și avantajul că nu viciază atmosfera laboratorului și nu necesită încăperi special amenajate pentru cromatografie. De asemenea, permit menținerea unei temperaturi interioare relativ constante, atunci cînd acest factor este important pentru procesul cromatografiei.

În partea de jos a camerei cromatografice se introduc cuve în care se adaugă soluție de fenol. Benzile cromatografice sînt fixate cu ajutorul unor cleme pe suportul care se găsește în partea superioară a camerei cromatografice în așa fel încît extremitatea la care se află linia de start să fie cufundată (1—2 cm) în soluție de fenol.

Camera cromatografică se închide ermetic și după 10—12 ore (în funcție de lungimea cromatogramei, de viteza de migrare a solventului și de natura hidrolizatului), benzile cromatografice sînt scoase, uscate la temperatura camerei și pulverizate cu soluție alcoolică de ninhidrină 0,1%. După aceea cromatogramele sînt introduse pentru 10—15 minute într-un termostat, reglat la 100—105°. Pe cromatograme se observă apariția unor

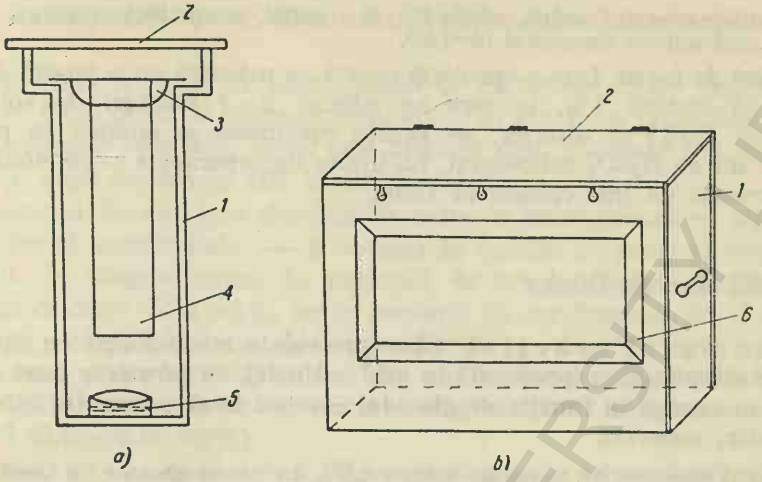


Fig. 18. Camere cromatografice:
a — pentru cromatografie unidimensională; *b* — pentru cromatografie bidimensională; *1* — pereții camerei cromatografice; *2* — placă de sticlă pentru asigurarea etanșeității; *3* — cuvă; *4* — hîrtie cromatografică; *5* — cristalizor cu solvent; *6* — perete de sticlă.

„pete", denumite „spoturi", ale aminoacizilor, localizate la distanțe diferite față de „linia de start". Raportul dintre distanța parcursă de substanță (*a*) și distanța parcursă de solvent (*b*) poartă denumirea de R_f (Retention factor) și este întotdeauna mai mic ca unitatea și specific pentru fiecare aminoacid în cazul cînd condițiile experimentale (temperatură, solvent, hîrtie cromatografică etc.) se mențin aceleași. De exemplu, R_f pentru glicină este de 0,28—0,30, pentru alanină, 0,56—0,58, iar pentru acidul glutamic, 0,27—0,29 (cromatografie ascendentă; solvent-fenolul).

Identificarea aminoacizilor prezenți în spoturi se face prin compararea R_f spoturilor cu R_f aminoacidului folosit drept martor.

1.4.5. REACȚII DE CULOARE SPECIFICE PENTRU GLUCOPROTEIDE

1.4.5.1. Reacția Molisch

Principiul reacției. Proteinele care conțin glucide, în prezența α-naftolului și acidului sulfuric concentrat, dau o colorație violetă. Sub acțiunea H_2SO_4 concentrat, glucoza se transformă în oximetilfurfurol, care reacționînd cu α-naftolul formează un compus colorat în violet.

Reactivi necesari: Cazeină, soluție 1%; 2) α-naftol, soluție 20% preparată în alcool 95°; 3) Acid sulfuric concentrat (d=1,84).

Modul de lucru. Într-o eprubetă uscată se măsoară cu o pipetă 4 ml soluție de cazeină 1%, la care se adaugă 2—3 picături de soluție de α-naftol (20%) și ulterior, pe pereții eprubetei se adaugă în proporții mici 2 ml de H_2SO_4 concentrat. La limita de separare a celor două soluții se formează un inel colorat în violet.

1.4.5.2. Reacția Dische

Principiul reacției. Glucoproteidele reacționează cu carbazolul sau cu difenilamina (preparată în acid sulfuric), cu formarea unei colorații roze sau cenușii în funcție de glucidul prezent în structura lor (glucoză și, respectiv, manoză).

Reactivi necesari: 1) Carbazol, soluție 0,5%, în alcool absolut; 2) Acid sulfuric soluție diluată (8 părți H_2SO_4 concentrat și 1 parte apă distilată); 3) Acid ribonucleic, soluție 1%.

Modul de lucru. 9 ml de acid sulfuric diluat (soluția 2) sînt răciți la 0°C. Se adaugă 1 ml soluție de acid ribonucleic 1% (soluția de analizat trebuie să conțină minimum 0,2 mg de zahăr) și amestecul se menține la 0°C. În continuare se adaugă cu o pipetă 0,3 ml de soluție de carbazol 0,5%, preparată în alcool absolut.

Probele, după agitare atentă, se încălzesc pe o baie de apă în clocot, timp de 10 minute și se răcesc într-un curent de apă de robinet.

Observații. Reacția Dische este frecvent folosită pentru determinarea cantitativă a glucidelor prezente în glucoproteide, citirea probelor efectuîndu-se la fotocolorimetru. Prezența triptofanului în mediul de reacție mărește eroarea metodei.

1.5. IDENTIFICAREA FIERULUI, SULFULUI, FOSFORULUI ȘI AZOTULUI ÎN COMPOZIȚIA PROTEINELOR

1.5.1. IDENTIFICAREA FIERULUI ÎN PREPARATUL DE HEMOGLOBINĂ

Noțiuni generale. Fierul este un element larg răspîndit în regnul animal și vegetal. În compoziția proteinelor și a enzimelor, de exemplu, în mioglobina musculaturii striate și a cordului, în gruparea prostetică a citocromilor, catalazei, peroxidazei, citocromoxidazei, precum și în hemul

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

hemoglobinei, fierul poate fi decelat prin metode rapide şi dozat cantitativ.

Fierul este bivalent în hemoglobină şi oxihemoglobină, oxigenul găsindu-se fixat printr-o grupare peroxidică. În gruparea protestică a enzimelor de oxido-reducere, fierul este bivalent cînd enzimele sînt reduse, şi trivalent cînd acestea se află în stare oxidată.

Conţinutul fierului este deosebit de mare în hemoglobină — pigmentul respirator al vertebratelor — şi variază în funcţie de sexul şi vîrsta animalului. În sîngele uman, la pacienţii de sex masculin, cantitatea de fier este de 52,3—52,4 mg%, iar la pacienţii de sex feminin, de 45,5 mg%. La copii, în prima lună de viaţă, fierul în sîngele total constituie 61—62 mg% şi după primul an de viaţă cantitatea lui scade la 41—42 mg%. În cantităţi extrem de mici, fierul este prezent în sînge şi sub formă ionizată (0,05—0,18 mg%).

Principiul metodei. Hemoglobina este mineralizată şi fierul rezultat sub formă de $FeCl_3$, după acidularea mediului cu acid clorhidric concentrat, reacţionează cu sulfocianura de amoniu, rezultînd tiocianatul de fier, care colorează soluţia în roşu aprins.

Reactivi necesari: 1) Hemoglobină uscată — 0,2 g; 2) Azotat de potasiu, în pudră — 0,1 g; 3) Carbonat de sodiu — 0,2 g; 4) Acid clorhidric concentrat; 5) Sulfocianură de amoniu, soluţie 20%.

Modul de lucru. Hemoglobina (0,2 g) uscată este mineralizată în prezenţa unui amestec de KNO_3 şi Na_2CO_3 în proporţie de 1 : 2 (0,1 g KNO_3 şi 0,2 g Na_2CO_3). Amestecul se agită energic pînă la omogenizare.

Conţinutul eprubetei se încălzeşte cu grijă la flacăra unui bec de gaz sub nişă pînă la mineralizarea completă a hemoglobinei. Produsul obţinut se dizolvă în apă distilată (aproximativ 1—1,5 ml), soluţia se acidulează cu HCl concentrat (reacţia acidă faţă de hîrtia de turnesol), iar apoi se filtrează.

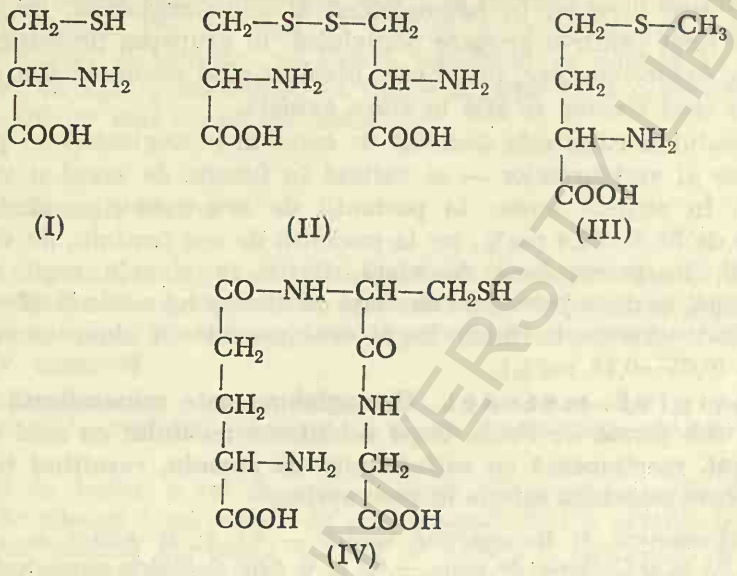
Filtratul este tratat cu 1 ml de soluţie de NH_4SCN 20%. În prezenţa fierului, soluţia se colorează în roşu aprins, datorită formării tiocianatului de fier $Fe(SCN)_3$ (1):

$$FeCl_3 + 3NH_4SCN \rightarrow Fe(SCN)_3 + 3NH_4Cl. \qquad (1)$$

1.5.2. IDENTIFICAREA SULFULUI ÎN OVALBUMINĂ

În compoziţia proteinelor, sulful se găseşte aproape exclusiv sub formă de cisteină (I), cistină (II) şi metionină (III). În molecula unor enzime, sulful este prezent sub formă de glutation (IV). Cantitatea de sulf proteic

prezentă în sîngele total este relativ mare, 140—150 mg%; în eritrocite, 160—175 mg%, iar în plasma sanguină, 125—130 mg%.



Principiul reacţiei. Sulful rezultat după mineralizarea proteinei reacţionează cu clorura de bariu, formînd un precipitat alb de sulfat de bariu.

Reactivi necesari: 1) Albumină, 0,2 g; 2) Azotat de potasiu, 0,1 g; 3) Carbonat de sodiu, 0,2 g; 4) Acid clorhidric concentrat; 5) Clorură de bariu, soluţie 2%.

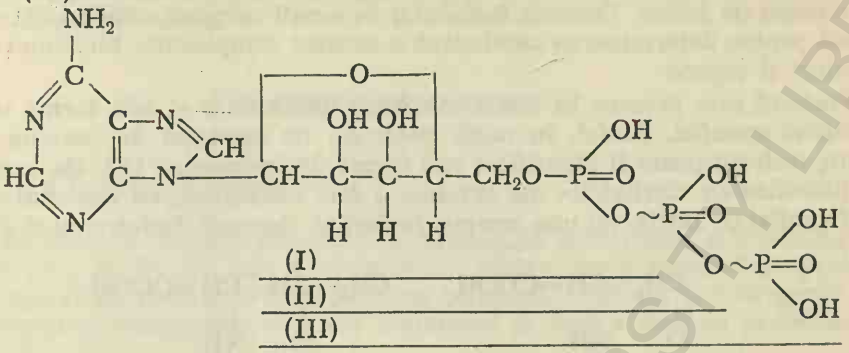
Modul de lucru. Într-un creuzet se cîntăresc 0,2 g de ovalbumină care se mineralizează în prezenţa a 8 g de amestec de KNO_3 şi Na_2CO_3 (1 : 2). Mineralizarea se consideră terminată cînd conţinutul creuzetului devine alb. Produsul obţinut se dizolvă în apă, se acidulează cu HCl concentrat şi se filtrează. La filtratul obţinut se adaugă 2 ml de soluţie de $BaCl_2$ 2%. Apariţia unui precipitat alb dovedeşte prezenţa sulfatului de bariu, $BaSO_4$, şi deci şi a sulfului în albumina analizată.

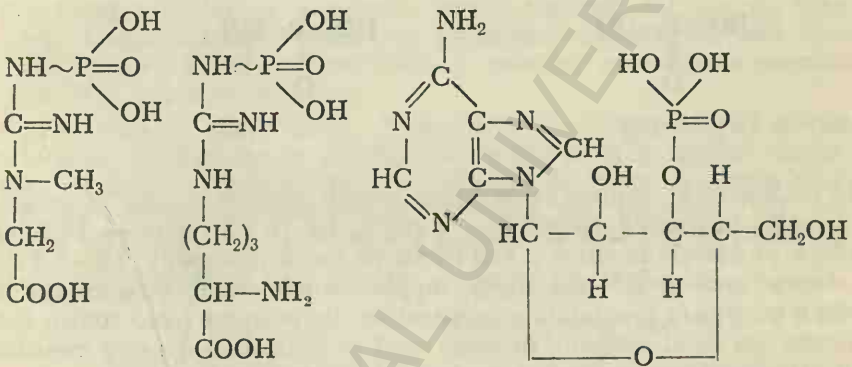
1.5.3. IDENTIFICAREA FOSFORULUI ÎN CAZEINĂ

Noţiuni generale. În compoziţia proteinelor, pe lîngă cele patru elemente fundamentale (carbon, hidrogen, oxigen şi azot), se întîlneşte frecvent, în cantităţi mici (0,2—0,5%), şi fosforul.

Fosforul are un rol deosebit de important în procesele energetice ale organismelor vii, fiind un element constitutiv al compuşilor macroergici: acidul adenozinmonofosforic (I), adenozindifosforic (II), adenozintrifosfo-

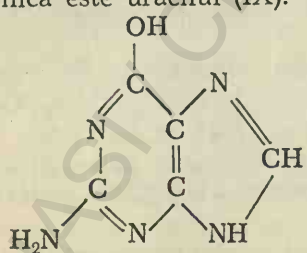
ric (III), acidul creatininfosforic (IV), argininfosforic (V) şi acidul adenilic (VI).



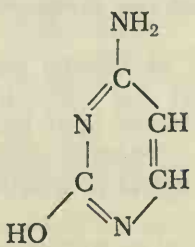


(IV) (V) (VI)

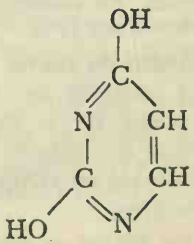
Relativ recent au fost descoperiţi şi alţi compuşi macroergici care conţin fosfor, asemănători ca structură cu *ATP* şi *ADP* şi care poartă denumirea de acizi guanozintrifosforic (*GTP*) şi respectiv guanozindifosforic (*GDP*), cînd baza purinică este guanina (VII), citozintrifosforic (*CTP*) şi citozindifosforic (*CDP*), cînd în compoziţia lor se întîlneşte citozina (VIII) şi uracil-trifosforic (*UTP*) şi uracildifosforic (*UDP*), cînd baza constitutivă de natură purinică este uracilul (IX).



(VII)



(VIII)

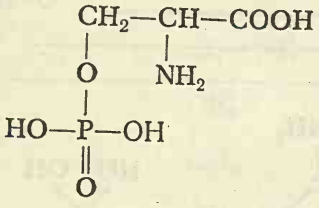


(IX)

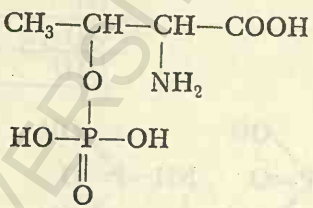
BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Acidul dezoxiribonucleic (*ADN*) și acidul ribonucleic (*ARN*) (v. fig. 1), lipoproteinele din creier și fosfoproteinele conțin, de asemenea, cantități însemnate de fosfor. Dozarea fosforului în acești compuși este curent utilizată pentru determinarea cantitativă a acestor componente biochimice în țesuturi și organe.

Fosforul este prezent în unele preparate biochimice și sub forma unor compuși specifici. Astfel, în unele proteine, de exemplu, în cazeina din lapte, fosforul poate fi identificat sub formă de fosfoserină (X). De curînd, în hidrolizatele clorhidrice ale cazeinei a fost identificat, cu ajutorul cromatografiei pe hîrtie, un nou compus fosforilat, denumit fosfotreonină (XI):



(X)



(XI)

În sîngele total, cantitatea de fosfor *proteic* variază și este, în medie, de 21,6 mg%; în plasma sanguină — 3 mg%, iar în eritrocite — 18,5 mg%. Fosforul se găsește în sînge și sub formă de fosfor anorganic (2,4—2,6 mg%, în sîngele total și 2,8—5,1 mg%, în plasma sanguină), ceea ce condiționează o purificare prealabilă a preparatelor de proteine (care conțin fosfor) obținute din serul sanguin, în cazul cînd se realizează dozarea cantitativă a proteidelor după conținutul procentual al fosforului.

Principiul metodei. Fosforul rezultat sub formă de acid fosforic după mineralizarea proteinei reacționează cu molibdatul de amoniu, formînd un precipitat galben de fosfomolibdat de amoniu.

Reactivi necesari: 1) Cazeină uscată, în pudră, 0,2 g; 2) Azotat de potasiu, 0,1 g; 3) Carbonat de sodiu, 0,2 g; 4) Acid azotic concentrat; 5) Molibdat de amoniu, soluție 20%. Se dizolvă 2 g de molibdat de amoniu în 50 ml de apă distilată fierbinte. Soluția se răcește, se aduce la 100 ml cu apă distilată și după 24 de ore se filtrează. Se recomandă păstrarea în flacoane bine închise; 6) Amoniac; 7) Acid acetic, soluție 10%.

Modul de lucru. 0,2 g de cazeină uscată sînt mineralizate în prezența unei cantități de 3—5 ori mai mare de amestec de KNO_3 și Na_2CO_3 (în proporție de 1 : 2), la flacăra unui bec de gaz, pînă la obținerea unui produs de culoare albă. Produsul rezultat se dizolvă în apă, soluția se acidulează cu HNO_3 concentrat și se filtrează pentru a îndepărta materialul carbonizat.

Din filtrat se iau 3 ml și se tratează cu 2 ml de soluție de molibdat de amoniu 20%. După agitare atentă, conținutul eprubetei se încălzește la

fierbere. În prezenţa acidului fosforic, rezultat din fosfoserina prezentă în cazeină, se formează un precipitat galben de fosfomolibdat de amoniu $H_4(NH_4)_3[P(Mo_2O_7)_6]$.

1.5.4. IDENTIFICAREA AZOTULUI

1.5.4.1. Reacţia Lassaigne

Elementele chimice prezente în compoziţia proteinelor şi analizate mai sus (Fe, S, P) nu sînt caracteristice pentru toate substanţele proteice. Singurul element care împreună cu carbonul, oxigenul şi hidrogenul este nelipsit în compoziţia oricărui aminoacid şi deci a fiecărei proteine este azotul.

Procentul azotului în proteinele native variază, în general, între 15 şi 18%. Determinarea conţinutului procentual al azotului este frecvent utilizată pentru calcularea cantităţii de proteine prezente în preparatele, ţesuturile şi lichidele biologice.

Principiul reacţiei. Proteina în prezenţa sodiului metalic se descompune cu formare de NaCN, care cu $FeSO_4$ şi în mediul alcalin formează complexul $Na_4[Fe(CN)_6]$. Ferocianura de sodiu în mediu acid formează cu sărurile fierului trivalent ($FeCl_3$) un precipitat de culoare albastră caracteristică, cunoscut sub numele de albastru de Berlin (1—3):

$$C, H, O, N, S, Hal + Na \xrightarrow{\text{încălzire}} NaCN + Na_2S + NaOH + NaHal \quad (1)$$

$$6NaCN + FeSO_4 \longrightarrow Na_2SO_4 + Na_4[Fe(CN)_6] \quad (2)$$

$$4FeCl_3 + 3Na_4[Fe(CN)_6] \longrightarrow \underset{\text{Albastru de Berlin}}{12NaCl + Fe_4[Fe(CN)_6]_3} \quad (3)$$

Reactivi necesari: Cazeină sau albumină uscată, 0,2 g; 2) Sodiu metalic, 0,15—0,2 g; 3) Sulfat de fier, soluţie 10%; 4) Clorură ferică, soluţie 2%; 5) Acid clorhidric concentrat.

Modul de lucru. Într-o eprubetă uscată se recoltează probe care conţin 0,1—0,2 g de proteină în stare uscată (cazeină sau ovalbumină), la care se adaugă o cantitate aproximativ egală de sodiu metalic[1]. Toate operaţiile descrise mai jos se efectuează sub nişă.

Eprubetele în care s-a produs reacţia sînt montate, cu ajutorul unui dop de cauciuc, în interiorul unor eprubete mai mari ca dimensiuni pentru a se evita eventualele accidente şi pierderea probei.

În eprubeta interioară se adaugă atent cu pipeta 5 ml de apă distilată. Resturile de sodiu metalic vor reacţiona cu apa, proces care este însoţit de degajare de căldură, explozii (atenţie!). La soluţia obţinută după filtrare se adaugă 1 ml de soluţie de $FeSO_4$ 10%, o picătură de soluţie $FeCl_3$ 2% şi mediul de reacţie se acidulează cu HCl concentrat.

---

[1] Atenţie! Se vor respecta indicaţiile cu privire la manipularea sodiului metalic.

Dacă proteina analizată conține azot în cantitate relativ mare se observă formarea unui precipitat abundent de culoare albastră, denumit albastru de Berlin, iar în cazul cînd conținutul azotului proteic este mic se constată numai o ușoară colorare în albastru a soluției.

1.6. ANALIZA CANTITATIVĂ

1.6.1. DETERMINAREA AZOTULUI TOTAL ȘI PROTEIC. METODA KJELDAHL

Principiul metodei. Proteinele în prezența acidului sulfuric concentrat și la cald se descompun în elementele constitutive C, H, N, O, P, S, Fe. Carbonul se oxidează cu formare de CO_2, hidrogenul cu formare de apă, fosforul cu formare de acid fosforic sau de fosfor mineral, iar azotul rezultat sub formă de amoniac reacționează cu H_2SO_4 prezent în mediul de reacție, formînd sulfat de amoniu. O parte din acidul sulfuric prezent în mediul de reacție participă la oxidarea substanțelor organice și, cedînd oxigenul, se transformă în acid sulfuros, care ulterior se reduce, degajîndu-se sub formă de hidrogen sulfurat.

Sulfatul de amoniu rezultat, în mediu puternic alcalin se descompune cu formare de amoniac liber și sulfat de sodiu. Amoniacul este distilat prin antrenare cu vapori de apă și captat într-un volum cunoscut de soluție de H_2SO_4 cu titrul stabilit anterior. Cunoscînd cantitatea de H_2SO_4 necesară pentru neutralizarea amoniacului distilat, se poate calcula cantitatea de azot în proba de analizat (reacțiile 1—4):

$$(NH_4)_2SO_4 + 2NaOH = Na_2SO_4 + 2NH_4OH \quad (1)$$

$$2NH_4OH \longrightarrow 2NH_3 + 2H_2O \quad (2)$$

$$(NH_4)_2SO_4 + 2NaOH = Na_2SO_4 + 2H_2O + 2NH_3 \quad (3)$$

$$H_2SO_4 + 2NH_3 = (NH_4)_2SO_4 \quad (4)$$

Reactivi necesari: 1) Acid sulfuric concentrat (d=1,84); 2) Sulfat de cupru, soluție 20%; 3) Hidroxid de sodiu, soluție 30%; 4) Hidroxid de sodiu, soluție N/10.

Prepararea soluției de NaOH N/10. NaOH și KOH pure și chimic pure sînt furnizate de obicei sub formă de baghete sau de granule, care în contact cu aerul absorb vaporii de apă și bioxidul de carbon, acoperindu-se cu un strat de carbonat de sodiu, ceea ce prejudiciază prepararea directă a soluțiilor de normalitate exactă. În practica de laborator se recomandă prepararea prealabilă de soluții concentrate de hidroxizi (40—50%) în care carbonatul de sodiu este insolubil și după 1—2 zile se depune sub forma unui precipitat alb. Determinîndu-se greutatea specifică a soluției de hidroxid de sodiu, care se decantează din soluția concentrată, se calculează concentrația NaOH (v. anexa) și se prepară soluții de normalitatea dorită.

BCU CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Exemplu. Să se prepare 1 l de soluție de NaOH *N*/10 dintr-o soluție de NaOH concentrată, a cărei greutate specifică este de 1,410. Concentrația hidroxidului de sodiu în soluție este de 38%. Echivalentul-gram al NaOH este egal cu 40,00. Pentru a prepara un litru de soluție *N*/10 va fi necesară o cantitate de hidroxid de sodiu egală cu:

$$40{,}00 \times 0{,}1 = 4 \text{ g NaOH.}$$

În soluția concentrată de NaOH de care dispunem în 100 ml se găsesc 38 g, deci 4 g se vor afla în 10,52 g soluție; greutatea specifică a soluției fiind 1,410 se calculează volumul în care se găsesc 10,52 g soluție de hidroxid de sodiu:

$$10{,}52 : 1{,}410 = 7{,}46 \text{ ml de soluție 38\% de NaOH.}$$

În consecință, pentru prepararea unei soluții de NaOH *N*/10 se vor lua 7,46 ml de soluție 38% de NaOH și se vor aduce la 1 l cu apă distilată (fără CO_2) într-un balon cotat.

5) Acid sulfuric, soluție *N*/10. Echivalentul-gram al acidului sulfuric este 49,04. O soluție de H_2SO_4 *N*/10 trebuie să conțină 4,904 g de H_2SO_4 la 1 l. În 100 ml de acid sulfuric concentrat (d=1,84) se găsesc 95,6 g de H_2SO_4 și prin urmare 4,904 g se vor găsi în 5,14 g de H_2SO_4 concentrat. Pentru prepararea soluției *N*/10 este necesar să se utilizeze: 5,14 : 1,84=2,8 ml de H_2SO_4 concentrat, care se vor aduce la 1 l cu apă distilată; 6) Roșu de metil, soluție 1%.

Modul de lucru

Mineralizarea preparatelor biologice. Se cîntărește o cantitate corespunzătoare de material biologic de analizat (în experiențe preliminare se stabilește, în funcție de natura materialului de analizat, cantitatea optimă necesară pentru analiză) în balonul Kjeldahl cu o capacitate de 100 ml, se adaugă 2—3 ml de H_2SO_4 concentrat, p.a. (d=1,84) și 5—6 picături de soluție de $CuSO_4$ 20% sau 2—3 cristale de sulfat de cupru (catalizator care are rolul de a accelera procesul de mineralizare a substanței proteice).

Mai pot fi utilizate drept catalizatori H_2O_2, Hg metalic, H_3PO_4, Se etc. Utilizarea acidului fosforic nu este însă recomandată, deoarece acest reactiv degradează sticlăria. Cele mai bune rezultate (mineralizare completă) au fost obținute în cazul utilizării unui amestec de K_2SO_4 și $CuSO_4$ (3 : 1), precum și cu amestecul format din 100 ml de acid sulfuric și 14 g de sulfat de potasiu.

Balonul Kjeldahl se montează în poziție înclinată într-un stativ metalic sub nișă și se încălzește cu grijă la flacăra unui bec de gaz. Conținutul balonului, în decursul primelor minute de mineralizare, devine negru și spumos. Pentru evitarea pierderii probelor se recomandă ca încălzirea să fie efectuată treptat și numai după ce conținutul a încetat să spumeze se intensifică încălzirea, mărind flacăra becului de gaz sau coborînd balonul Kjeldahl.

În general, mineralizarea se consideră terminată cînd lichidul din balon s-a decolorat complet. Pentru evitarea erorilor se recomandă însă verificarea și punerea la punct a metodei folosind o proteină al cărei conținut în azot este cunoscut sau o substanță, de exemplu, $(NH_4)_2SO_4$, ce permite prepararea de soluții cu un conținut procentual de azot cunoscut și care se conservă relativ ușor.

În paralel se face o probă martor cu aceiași reactivi utilizați pentru mineralizarea probei care conține preparatul biologic de cercetat, însă în care ultimul este înlocuit cu un volum egal de apă distilată.

Descrierea aparatului de distilat. În funcție de cantitatea de azot care urmează să fie dozată, de aspectul și dimensiunile aparatului deosebim următoarele variante ale aparatului de distilat: micro- și macro — Kjeldahl, aparatul Parnas-Wagner și aparatul Pregl. În general, toate aparatele sînt alcătuite din aceleași părți componente ca și aparatul Parnas-Wagner descris mai jos și care constă din: balon generator de vapori *1*, recipient intermediar *2*, balon cu substanța mineralizată *3* prevăzut cu pîlnia cu robinet *5* și refrigerentul *4* (fig. 19).

În balonul generator de vapori cu o capacitate de 0,5—1 l se introduce apă pînă la 2/3 din volumul său. Se adaugă cîteva picături de acid sulfuric concentrat pentru neutralizarea amoniacului. Pentru evitarea supraîncălzirii balonului și a fierberii neregulate a apei se adaugă cîteva bucățele de piatră ponce. Balonul este, de asemenea, prevăzut cu două tuburi de sticlă (*a* și *b*). Dacă extremitatea externă a tubului *a* este închisă cu ajutorul unei cleme Mohr, prin intermediul unui tub de cauciuc, vaporii de apă vor ajunge în balonul cu mineralizat *3* prin tubul *b*.

Recipientul intermediar *2* servește la spălarea aparatului ce se realizează după fiecare determinare. El este prevăzut în partea inferioară cu un orificiu de evacuare care în timpul distilării amoniacului este închis cu un robinet cu șlif sau cu o clemă Mohr.

Aparatul Parnas-Wagner trebuie spălat cu vapori de apă timp de 15—20 de minute înaintea fiecărei determinări pentru îndepărtarea eventualelor impurități. Dacă montarea aparatului este realizată recent și

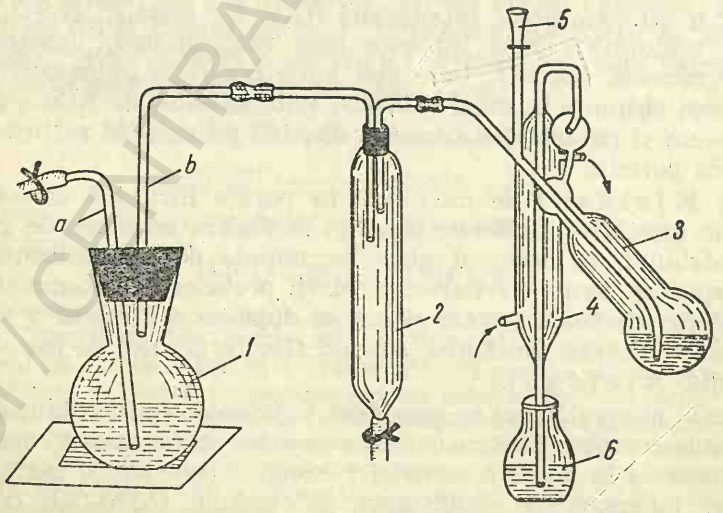


Fig. 19. Aparatul Parnas-Wagner utilizat pentru distilarea amoniacului rezultat după mineralizarea probelor biologice.

în acest scop s-au utilizat tuburi de cauciuc noi pentru asamblarea părților componente ale aparatului se recomandă ca spălarea aparatului să se facă timp de minimum 6—8 ore, deoarece tuburile noi de cauciuc, la cald, pun în libertate cantități apreciabile de azot care pot influența negativ rezultatele analizelor.

Balonul *3*, în care se introduce substanța mineralizată, comunică prin intermediul unui tub de sticlă cu balonul generator de vapori, iar printr-un alt tub, cu refrigerentul. Prin pîlnia *5*, cu care este prevăzut acest balon, se introduc reactivii și mineralizatul, după care se închide robinetul.

Recipientul *6* servește la captarea amoniacului distilat și conține în momentul determinării o cantitate cunoscută de soluție titrată de acid.

Distilarea amoniacului. După răcirea balonului Kjeldahl în care s-a realizat mineralizarea se adaugă cu pipeta în acest balon 5 ml de apă distilată, se agită și conținutul balonului se încălzește ușor la flacăra unui bec de gaz pentru dizolvarea completă a reziduului. Soluția obținută se trece cantitativ în recipientul *3* al aparatului Parnas-Wagner prin pîlnia *5*. În acest scop, balonul Kjeldahl se spală de 2—3 ori cu volume mici de apă distilată (2—3 ml).

În recipientul *6* se adaugă cu pipeta 10 ml de soluție de H_2SO_4 *N*/10 la care se adaugă 3—4 picături de indicator (soluție roșu de metil). Pentru a se evita pierderea amoniacului, partea inferioară a refrigerentului *4* se introduce în soluția titrată de acid sulfuric din recipientul de captare *6*.

Se adaugă cu pipeta prin pîlnia *5* în recipientul *3*, care conține substanța mineralizată, soluție de NaOH 30% sau de KOH pînă cînd reacția mineralizatului devine alcalină, moment în care culoarea verde-deschis a lichidului virează în albastru, datorită formării hidroxidului de cupru.

Se închide tubul *a* al balonului generator de vapori. Vaporii de apă trecînd prin mineralizatul alcalinizat antrenează amoniacul care se degajă și este captat în soluția titrată de acid sulfuric.

Distilarea durează 20—30 de minute. Pentru a se aprecia dacă distilarea este terminată, pe o hîrtie de turnesol roșu se recoltează o picătură de distilat (după spălarea prealabilă cu apă distilată a capătului refrigerentului). Dacă reacția distilatului este alcalină, distilarea este terminată. În acest caz, recipientul de captare *6* se extrage de sub refrigerent, capătul inferior al acestuia se spală cu volume mici de apă distilată și excesul de acid sulfuric se titrează cu soluție de NaOH *N*/10 pînă la virarea colorației soluției de la roșu la galben. Se procedează în mod similar și cu proba martor.

Pentru calcularea rezultatelor este necesar să se cunoască factorul soluțiilor de H_2SO_4 și NaOH *N*/10, folosite pentru captarea amoniacului și pentru titrarea excesului de acid sulfuric.

Determinarea factorului soluției de H_2SO_4. Se cîntăresc la balanța analitică între 0,15 și 0,2 g de $Na_2C_2O_4$ (greutate echivalentă 67,007) într-un creuzet de platină, care apoi se încălzește la flacăra unui bec de gaz timp de 20—30 de minute pînă cînd substanța din creuzet începe să se topească. După răcirea creuzetului, conținutul acestuia se trece cantitativ într-un balon Erlenmeyer sau Berzelius și se titrează în prezență de

metiloranj, cu o soluție de H_2SO_4 $N/10$ pînă la portocaliu. Soluția se încălzește la fierbere timp de 2 minute, se răcește și se titrează din nou pînă la virajul culorii galbene în galben-portocaliu. Reacția de neutralizare are loc după ecuația (5):

$$Na_2CO_3 + H_2SO_4 = Na_2SO_4 + CO_2 + H_2O. \quad (5)$$

Titrul soluției de H_2SO_4 este calculat după formula (6):

$$T = \frac{a \cdot 49{,}004}{n \cdot 67{,}007}, \quad (6)$$

unde a reprezintă cantitatea de oxalat de sodiu cîntărită (folosită), iar n, numărul de ml de soluție H_2SO_4 $N/10$ folosiți pentru titrare. Factorul soluției de H_2SO_4 va fi egal cu:

$$\frac{T_{real}}{T_{teoretic}} = \frac{T_{real}}{0{,}0049}$$

Determinarea factorului soluției de NaOH $N/10$. Se cîntărește la balanța analitică o cantitate de acid oxalic, cuprinsă între 0,15 și 0,20 g, se dizolvă în apă distilată proaspăt fiartă și răcită (în aproximativ 30,0—40,0 ml) și se titrează cu soluția de NaOH $N/10$ în prezența fenolftaleinei ca indicator. Ecuația reacției de neutralizare este următoarea (7):

$$\begin{matrix} COOH \\ | \\ COOH \end{matrix} + 2NaOH \longrightarrow \begin{matrix} COONa \\ | \\ COONa \end{matrix} + 2H_2O. \quad (7)$$

Greutatea echivalentă a acidului oxalic este 63,034, iar a hidroxidului de sodiu — 40,005. Titrul soluției va fi egal cu (8):

$$T = \frac{a \cdot 40{,}005}{n \cdot 63{,}034}, \quad (8)$$

unde a reprezintă cantitatea de acid oxalic, exprimată în grame și luată pentru determinarea titrului și n — numărul de ml de soluție de NaOH $N/10$ utilizați pentru titrare. Factorul soluției va fi egal cu:

$$\frac{T_{real}}{T_{teoretic}} = \frac{T_{real}}{0{,}004},$$

unde 0,004 este cantitatea de NaOH, exprimată în grame, dintr-un ml de soluție de hidroxid de sodiu de normalitate exactă $N/10$.

Observații. Determinarea factorului celor două soluții se realizează curent înainte de a trece la dozările cantitative.

Calculul rezultatelor. Dacă pentru titrarea excesului de H_2SO_4 rămas după captarea amoniacului s-au utilizat 5,3 ml de soluție NaOH $N/10$ ($f=1$), atunci din cei 10 ml de H_2SO_4 utilizați inițial au fost consumați

BCU / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

4,7 ml pentru neutralizarea NH_3 distilat. La un ml de soluție H_2SO_4 *N*/10 corespund 1,4 mg de azot[1].

Cantitatea de azot în proba de analizat va fi egală cu: $1,4 \times 4,7 = 6,58$ mg. Dacă pentru analiză au fost recoltate 42 mg substanță proteică, atunci cantitatea de azot din probă, exprimată în mg%, va fi egală cu:

$$(6,58 \times 100) : 42 = 15,66 \text{ mg}\%.$$

Observații. În cazul determinării azotului total în lichidele biologice (sînge, ser, plasmă, lichid cefalorahidian etc.), pe lîngă azotul proteic este dozat concomitent și azotul restant, în compoziția căruia intră azotul aminoacizilor, ureei, creatininei, indicanului și o cantitate mică de amoniac prezentă în stare liberă în aceste preparate. Azotul dipeptidelor și tripeptidelor va fi, de asemenea, dozat ca azot restant, deoarece acestea nu sînt precipitate cu reactivii caracteristici pentru precipitarea proteinelor.

În tabela 6 sînt redate raporturile cantitative dintre conținutul procentual al azotului total, azotului proteic și azotului globulinelor pentru diferite lichide biologice.

Tabela 6

Conținutul procentual al azotului în diferite lichide biologice

	% azot		
	Total	Proteic	Globuline
Sînge total	2,6—3,5	— [1]	— [1]
Plasma sanguină	1,2	1,33—1,59	13,5—15,1[2]
Ser sanguin	1,18	1,1—1,2	— [1]

[1] Nu s-a determinat.
[2] Procente din azotul total.

Temă:

1. Să se calculeze cantitatea de $(NH_4)_2SO_4$ necesară pentru prepararea a 200 ml soluție care conține 1 mg de azot într-un ml de soluție.

2. Se dă o soluție de fibrină care conține 8 g de azot în 500 ml. Se întreabă cîți mililitri de soluție trebuie să se ia pentru a avea o probă care să conțină 10 mg de azot?

3. Într-o probă de 0,5 g gelatină s-a determinat, prin metoda Kjeldahl, azotul — 0,06 g *N*. Se întreabă care este conținutul procentual al proteinelor în preparatul de gelatină?

[1]) Din reacția (4) se vede că 4,9 mg H_2SO_4, care se găsesc dizolvate în 1 ml de soluție *N*/10, corespund la 1,7 mg NH_3 (soluțiile de aceeași normalitate sînt echivalente). În 1,7 mg NH_3 se găsesc 1,4 mg N_2, deci 1 ml soluție H_2SO_4 *N*/10 corespunde la 1,4 mg N_2.

BCU CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

1.6.2. DETERMINAREA AZOTULUI RESTANT. METODA CONWAY

Principiul metodei. Amoniacul în stare gazoasă difuzează dintr-o celulă unde presiunea lui este relativ mare într-o altă celulă vecină, unde este captat cu ajutorul unei soluții titrate.

Reactivi necesari: 1) Acid sulfuric, soluție *N*/100; 2) Hidroxid de sodiu, soluție *N*/100; 3) Hidroxid de sodiu, soluție 33%; 4) Indicator Taschiro. În 100 ml de soluție 0,1% de roșu de metil, preparată în alcool absolut se adaugă cu pipeta 25 ml de soluție 0,1% de albastru de metilen preparată, de asemenea, în alcool. Din soluția astfel obținută se prepară un nou amestec, care constă din roșu de metil, albastru de metilen și apă (1 : 1 : 2 volum/volum) și la care se adaugă, picătură cu picătură, soluție de hidroxid de sodiu (se recomandă folosirea soluțiilor necarbonatate) pînă la dispariția coloratiei roșii a soluției. Indicatorul roșu de metil în cazul neutralizării soluției acide și crearea unui mediu ușor alcalin colorează soluția în verde, culoarea inițială a indicatorului fiind violet-pur. Albastrul de metilen are un rol secundar, prezența lui în soluție creînd posibilitatea sesizării la timp a punctului de viraj; 5) Acid sulfuric concentrat; 6) Persulfat de potasiu, preparat; 7) Vaselină sau amestec de 3 părți de vaselină și 1 parte parafină. Folosirea amestecului permite, spre deosebire de folosirea vaselinei, introducerea probelor în termostat la o temperatură de 37—38°C.

Descrierea celulei Conway. Celula Conway, confecționată în mod obligatoriu din sticlă Jena, constă din două compartimente concentrice: unul exterior, cu pereții groși și cu marginea superioară șlefuită, și unul interior, ai cărui pereți sînt paraleli cu pereții celui exterior, însă mai puțin înalți. Înălțimea compartimentului interior este, aproximativ, de 2 ori mai mică decît a compartimentului exterior, iar capacitatea lui este de aproximativ 5 ml. Celula Conway este prevăzută cu o placă de sticlă șlefuită, care permite închiderea ermetică în timpul experienței (fig. 20).

Modul de lucru. Într-un balon Kjeldahl, cu o capacitate de 30—40 ml, se introduce 0,1 ml de filtrat deproteinizat după tehnica Folin

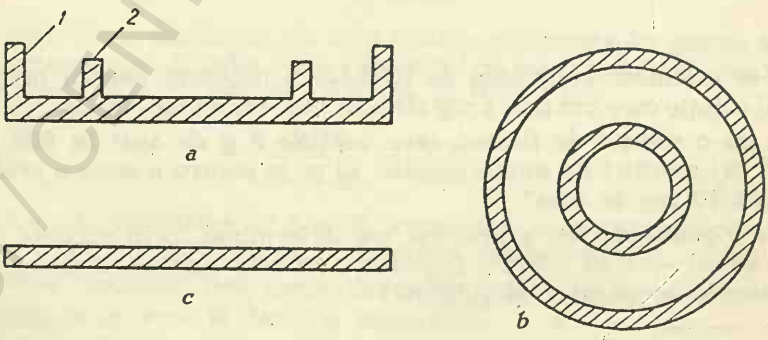


Fig. 20. Celula Conway:
a — secțiune longitudinală; *1* — peretele exterior al celulei; *2* — peretele interior al celulei; *b* — secțiune transversală prin celula Conway; *c* — placă de sticlă șlefuită.

sau Benedict, la care se adaugă 0,5—1 ml de acid sulfuric concentrat și 0,2—0,25 g de persulfat de potasiu. Mineralizarea se realizează la flacăra unui bec de gaz, pînă în momentul cînd conținutul balonului, colorat inițial în verde, capătă o nuanță albastră, sau devine chiar incolor. Mineralizatul este răcit și apoi trecut cantitativ în compartimentul exterior al celulei Conway. Volumul total (mineralizat plus apa distilată folosită pentru trecerea cantitativă a acestuia în compartimentul exterior al celulei Conway) nu trebuie să depășească 2 ml.

În compartimentul interior al celulei Conway se introduc 1—2 ml de soluție de H_2SO_4 *N*/100 (volumul se stabilește experimental în funcție de cantitatea de azot restant în proba de analizat) și 2—3 picături de indicator Taschiro.

Celula Conway este acoperită parțial cu placa de sticlă șlefuită, care a fost în prealabil gresată (cu vaselină), iar prin orificiul rămas se adaugă cu pipeta soluție 33% de hidroxid de sodiu pînă în momentul cînd coloratia soluției din compartimentul exterior al celulei devine albastră, datorită formării hidroxidului cupric. Cantitatea de soluție de hidroxid de sodiu 33% trebuie stabilită în prealabil prin încercări, deoarece pentru neutralizarea soluției din compartimentul exterior al celulei este necesar un timp extrem de redus, menținerea celulei deschise favorizînd difuzarea amoniacului în exterior.

Celula Conway este închisă ermetic și prin mișcări circulare prudente se realizează omogenizarea conținutului din compartimentul exterior. În cazul cînd determinarea azotului restant se realizează la temperatura camerei, celula Conway se lasă în repaus 6 pînă la 8 ore. După acest timp, celula se deschide și acidul sulfuric din vasul interior este titrat cu soluție de hidroxid de sodiu *N*/100. Realizarea experienței în termostat reduce timpul necesar difuziei la jumătate.

Calculul rezultatelor se face ca în cazul determinării azotului proteic, ținînd seama de faptul că 1 ml de soluție de H_2SO_4 *N*/100 corespunde la 0,14 mg de azot.

Exemplu de calcul. Două probe paralele (1 ml mineralizat) au fost titrate cu soluție NaOH *N*/100. Media celor două titrări a fost de 1,88 ml, iar factorul soluției, 1,09. Pentru titrarea martorului s-au utilizat 4,88 ml de soluție NaOH *N*/100. Conținutul azotului în mineralizatul analizat a fost:

$$(4{,}88 \times 1{,}03) - (1{,}88 \times 1{,}03) = 3{,}27 \text{ ml soluție NaOH } N/100$$

$$3{,}27 \times 0{,}14 = 0{,}458 \text{ mg } N_2/\text{ml de mineralizat}$$

$$0{,}458 \times 100 = 45{,}8 \text{ mg\% } N_2.$$

Temă. Se dau 2 ml soluție de H_2SO_4 *N*/100. Se cere să se calculeze cantitatea maximă de azot care poate fi captată în cei 2 ml de H_2SO_4 *N*/100.

1.6.3. DETERMINAREA AZOTULUI TOTAL DUPĂ METODA KJELDAHL MODIFICATĂ DE ABDERHALDEN ŞI FODOR[1]

Într-un balon Kjeldahl (cu fund rotund confecţionat din sticlă Jena), cu capacitate de 180—200 ml, se introduce materialul de analizat: 0,1 ml de ser sanguin, 1 ml urină normală sau patologică, 1—5 ml de extract vegetal (volumul variază în funcţie de gradul de diluare al extractului şi de cantitatea de proteină prezentă în substratul din care a fost obţinut extractul). La proba de analizat se adaugă cu pipeta 2 ml de acid sulfuric concentrat şi 4—5 cristale de sulfat de cupru. Mineralizarea se face sub nişă, respectînd indicaţiile pentru dozarea azotului după metoda Kjeldahl.

După mineralizare, conţinutul balonului se răceşte la temperatura camerei şi balonul Kjeldahl se montează la instalaţia de distilare a amoniacului cu ajutorul unui dop de cauciuc prevăzut cu două orificii şi două tuburi de sticlă (v. fig. 21). Partea inferioară a tubului de sticlă *a* trebuie să fie permanent introdusă în soluţia din balonul Kjeldahl, iar tubul *b* conectat la două vase de spălare v_1 şi v_2 prin intermediul legăturilor de cauciuc. Vasul de spălare v_2 este pus în legătură cu trompa de vid.

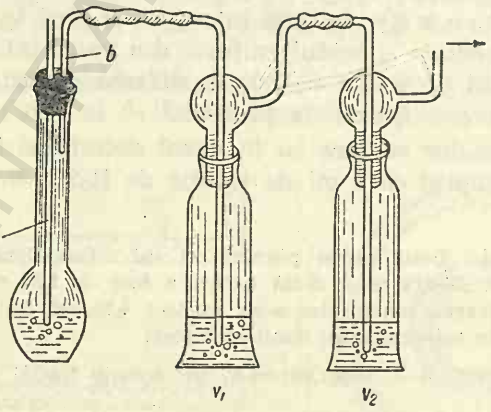


Fig. 21. Instalaţie pentru distilarea amoniacului după metoda Abderhalden şi Fodor.

[1] Principiul metodei şi reactivi necesari vezi la metoda Kjeldahl.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

În vasele de spălare v_1 și v_2 se introduc înainte de a începe distilarea amoniacului cîte 10 ml (exact!) de soluție de H_2SO_4 0,1 *N*, la care se adaugă 10—14 ml de apă distilată și 4—5 picături de roșu de metil.

Se încălzește lent balonul Kjeldahl la flacăra unui bec de gaz, după punerea, în prealabil, în funcțiune a trompei de vid. Cînd soluția din balonul Kjeldahl este barbotată se introduce prin tubul de sticlă *a* și cu ajutorul unei pipete soluție de NaOH 33%. Soluția de hidroxid de sodiu este aspirată în balon și conținutul acestuia se încălzește ușor, lichidul colorîndu-se în verde-deschis datorită reacției acide a mediului și prezenței sulfatului de cupru. În momentul în care reacția mediului devine alcalină, conținutul balonului se colorează în albastru-intens datorită formării $Cu(OH)_2$ și, în final, devine negru (CuO). În acest moment se întrerupe adăugarea soluției de NaOH 33% și se începe încălzirea balonului.

Amoniacul degajat este antrenat de curentul de aer creat cu ajutorul trompei de vid și este captat de cele două vase de spălare v_1 și v_2 care conțin soluție titrată de acid sulfuric. După 10—15 minute se întrerupe încălzirea continuîndu-se încă 20 de minute aspirarea cu pompa de vid, timp absolut necesar pentru distilarea completă a amoniacului prezent în lichidul din balonul Kjeldahl. Pentru control se deconectează legătura dintre balonul Kjeldahl și vasul de spălare v_1 și se controlează reacția acidă sau alcalină a soluției cu ajutorul unei hîrtii de turnesol. (Cînd hîrtia de turnesol nu se mai colorează în albastru, distilarea amoniacului este terminată.)

Conținutul celor două vase (v_1 și v_2) se reunește și se titrează cu o soluție de NaOH 0,1 *N* pînă în momentul virării colorației roșului de metil de la roșu la galben-deschis.

Calculul rezultatelor se face ținînd seama de faptul că 1 ml de soluție de NaOH 0,1 *N* corespunde la 1,4 mg de azot.

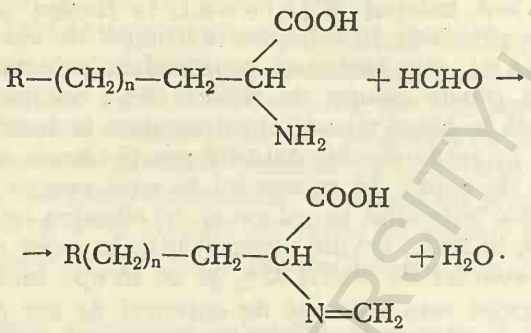
Exemplu: pentru titrare s-au folosit 5,1 ml de soluție de NaOH 0,1 *N*. Amoniacul a neutralizat din cei 20 ml de soluție de H_2SO_4 0,1 *N*, 14,9 ml. Cantitatea de azot în proba de analizat va fi egală cu: $1,4 \times 14,9 = 20,86$ mg. Dacă pentru determinarea azotului s-a folosit 1 ml de urină, atunci în 100 ml de urină se vor găsi 2,08 g de azot.

În condiții normale, cantitatea de azot eliminată în urină, ca urmare a metabolismului proteic, este de 16 g de azot în 24 de ore.

1.6.4. DETERMINAREA AZOTULUI AMINOACIZILOR. METODA SÖRENSEN

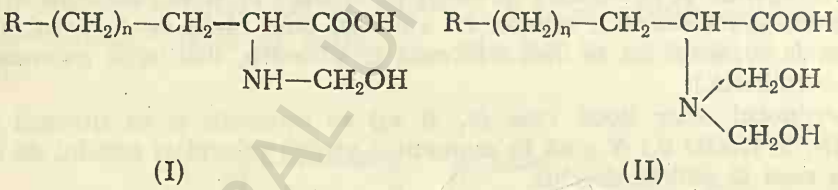
Principiul metodei. Grupările amino (—NH_2) ale aminoacizilor sînt blocate cu ajutorul aldehidei formice și grupările carboxil rămase libere sînt titrate cu hidroxid de sodiu.

În general, reacţia de blocare a grupărilor aminice era considerată o reacţie simplă, care decurge cu formare de derivaţi metilenici — metilenaminoacizii şi apă (1):



(1)

De curînd s-a stabilit însă că reacţia dintre aldehida formică şi gruparea $—NH_2$ a aminoacizilor decurge în două etape succesive şi fără formare de apă. În prima etapă se formează N-monoximetilaminoacidul respectiv (I), iar în a doua etapă, acest compus reacţionează cu încă o moleculă de aldehidă formică şi trece în N-dioximetilaminoacid (II):



(I) (II)

Reactivi necesari: 1) Extract vegetal, ser sanguin deproteinizat sau soluţie de peptonă 2%; 2) Hidroxid de sodiu, soluţie 0,2 *N;* 3) Fenolftaleină, soluţie 1%, preparată în alcool; 4) Aldehidă formică. 100 ml de formol, soluţie 30%, sînt neutralizaţi în prezenţa fenolftaleinei ca indicator (1 ml de soluţie 1%) cu soluţie de hidroxid de sodiu 0,2 *N* pînă la apariţia unei colorаţii roz pal, persistente 1 minut.

Modul de lucru. Într-un balon Erlenmeyer de 50 ml se adaugă cu pipeta 20 ml de extract vegetal (soluţie de peptonă 2% sau ser sanguin deproteinizat) care sînt neutralizaţi cu NaOH, soluţie 0,2 *N*. Se adaugă apoi cu pipeta 5 ml de aldehidă formică (formol neutralizat) şi după 5 minute amestecul este titrat cu soluţie de NaOH 0,2 *N* pînă la colorarea soluţiei în roşu sau roz intens, în prezenţa fenolftaleinei ca indicator.

Proba martor constă din 20 ml de apă distilată, 5 ml de aldehidă formică titrată şi se titrează în aceleaşi condiţii cu soluţie de NaOH 0,2 *N* pînă la roz-pal, cînd la amestec se mai adaugă încă o picătură de aldehidă formică.

Calculul rezultatelor. 1 ml de soluţie de NaOH 0,2 *N* corespunde la 0,0028 g de azot aminic. Cantitatea de azot aminic în proba cercetată, exprimată în g%, va fi egală cu:

$$(a—b)\times 0{,}0028 = „c“ \text{ g},$$

unde *a* este numărul de mililitri de soluție de NaOH 0,2 *N* adăugați după neutralizarea filtratului; *b* — ml de soluție de NaOH 0,2 *N* utilizați pentru titrarea probei martor.

Exemplu. Fie 0,25 ml de soluție de NaOH 0,2 *N* folosiți pentru titrarea martorului și 4,8 ml de NaOH, soluție 0,2 *N*, folosiți pentru titrarea probei care conține 20 ml soluție de peptonă 2%.

$$(4{,}80-0{,}25)\cdot 0{,}0028=0{,}01274 \text{ g } N_2 \text{ — aminic sau:}$$

$$\frac{100\times 0{,}01274}{0{,}4}=3{,}18 \text{ g\% } N_2 \text{ — aminic.}$$

Observații. Titrarea grupărilor aminice cu formol după metoda Sörensen permite determinarea majorității aminoacizilor prezenți în soluție, fiind dozat aproximativ 97% din azotul aminic. Excepție fac însă cîțiva aminoacizi, care influențează rezultatele: prolina, tirozina, acizii diaminomonocarboxilici. Folosirea metodei Sörensen pentru titrarea azotului aminic în extractele vegetale sau în lichidele biologice conservate cu ajutorul soluțiilor tampon de bicarbonați sau de fosfați este complicată datorită, pe de o parte, prezenței în soluție a acidului carbonic, iar pe de altă parte, faptului că fosfații primari trec, prin titrarea soluției cu alcali (la *p*H aproximativ 7), în fosfați secundari, în timp ce fenolftaleina colorează soluția în roz pal la *p*H = 8,8.

1.6.5. DETERMINAREA PROTEINELOR. METODA ROBINSON ȘI HOGDEN[1]

Principiul metodei se bazează pe reacția biuretului, intensitatea colorației rezultată fiind măsurată colorimetric.

Reactivi necesari: 1) Peptonă, soluție 1%; 2) Hidroxid de sodiu, soluție 3%; 3) Sulfat de cupru, soluție 10%.

Modul de lucru. Într-un balon cotat de 25 ml se iau 2,5 ml de ser sanguin și conținutul balonului se aduce la semn cu apă distilată, evitîndu-se agitarea intensă și formarea de emulsii. Într-o eprubetă de centrifugă, terminată în conus, se pun cu pipeta 2,5 ml de ser sanguin diluat, 4,5 ml de soluție de NaOH, 3% și 0,5 ml de soluție de $CuSO_4$, 10%. Se fac 2—3 probe paralele cu ser, precum și o probă martor în care serul este înlocuit cu apă distilată.

După agitare probele sînt lăsate în repaus 10 minute și apoi centrifugate la 4 000—5 000 turații/minut, timp de 5 minute. Partea alicotă este

[1] Fotometria este curent utilizată în laboratorul de biochimie, devenind una din metodele cele mai frecvent folosite datorită exactității rezultatelor și numeroaselor avantaje pe care le prezintă în comparație cu alte metode. În manualul de față sînt expuse numeroase metode în care se folosește fotometria și în consecință considerăm oportună explicarea principiilor de bază ale fotometriei.

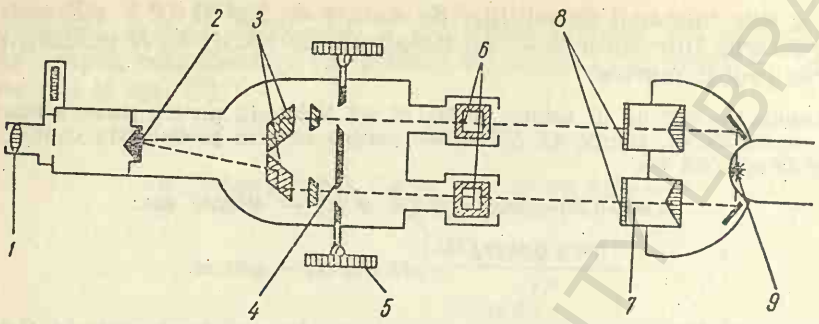


Fig. 22. Schema fotoelectrocolorimetrului Pulfrich (modelul orizontal).

decantată cu grijă în cuvele fotometrului și probele sînt citite folosindu-se filtrul galben, corespunzător lungimii de undă de 560 mμ.

La această lungime de undă, filtrul colorat în galben permite pătrunderea exclusivă a razelor luminoase din regiunea spectrului în care absorbția pentru soluția cercetată (reacția biuretului) este maximă. Datorită acestui fapt, prezența altor substanțe sau a impurităților colorate, care absorb însă razele luminoase în altă regiune a spectrului, nu influențează rezultatele citirii la aparat. Fotometrul Pulfrich, descris mai jos, este dotat cu o trusă de filtre, care împart regiunea vizibilă a spectrului în mai multe părți, fiecare filtru corespunzînd unei microregiuni cuprinse între valori bine determinate.

Fotometrul Pulfrich solicită observația vizuală, și citirea rezultatelor (fotometrarea) se bazează pe egalarea intensității de culoare observată în cele două jumătăți semicirculare ale cîmpului vizual. Razele de lumină care provin de la o sursă luminoasă (filamentul lămpii electrice *9*) (fig. 22) traversează dispozitivul *7* prevăzut cu sticle mate *8* și pătrund în cuvele *6* care conțin proba martor și proba de cercetat, fiind reflectate de prismele *3* în direcția lentilei *2*, unde sînt focalizate.

Datorită diferenței de concentrație dintre proba martor ce nu conține substanța de cercetat și este în consecință incoloră și proba de cercetat care este colorată, în ocularul *1*, cele două jumătăți semicirculare apar diferit colorate. Folosindu-se diafragma *4*, prin manipularea tamburului *5*, se egalează intensitatea de culoare din cele două jumătăți semicirculare ale ocularului. Dacă fasciculul luminos care traversează cuva cu soluție de cercetat nu este micșorat cu ajutorul diafragmei (100%), atunci egalarea intensității colorației se realizează cu ajutorul diafragmei corespunzătoare soluției de control (martorului). Această operație se realizează cu ajutorul celor două tambure gradate pe care este indicată mărimea diafragmei, exprimată în procente. Gradul de diafragmare pentru soluția martor este direct proporțional cu absorbția luminii de către soluția colorată (proba de analiză). Datorită faptului că fasciculele luminoase care traversează cele două soluții sînt deviate de către sistemul optic al apara-

tului, în realitate tamburul drept va corespunde jumătății semicirculare din partea stîngă a ocularului, și invers.

Fotometria se bazează pe legea Lambert-Beer, care stabilește că în condiții asemănătoare, între cantitatea de lumină incidentă și cantitatea luminii reflectate, pe de o parte, și concentrația substanței colorate (soluția de cercetat) și grosimea stratului acesteia, pe de altă parte, există o relație bine stabilită, care poate fi exprimată astfel (1):

$$\frac{I}{I_o} = e^{-kdc}, \qquad (1)$$

unde:

I este intensitatea fasciculului de lumină, care a traversat cuva cu substanța colorată;
I_o — intensitatea fasciculului luminos inițial;
e — baza logaritmilor naturali;
k — coeficient constant, specific pentru substanța analizată, care caracterizează capacitatea de absorbție a acesteia;
d — grosimea stratului de soluție din cuvă, exprimată în cm; și
c — concentrația substanței în soluția analizată.

Logaritmînd, formula (1) poate fi scrisă și sub forma următoare (2):

$$\log \frac{I_o}{I} = kdc. \qquad (2)$$

Relația $\frac{I_o}{I}$ sau $\log \frac{I_o}{I}$ va avea o valoare cu atît mai mare cu cît intensitatea luminii care a trecut prin soluție va fi mai mică. Această relație $\frac{I_o}{I}$ care poate fi exprimată valoric poartă denumirea de extincție (E) și se exprimă prin relația:

$$E = kdc.$$

Din această formulă, care exprimă relația dintre concentrația substanței și grosimea stratului acesteia, se poate calcula concentrația unei substanțe „x" în soluție (3):

$$C_x = \frac{E}{kd}; \quad C_x = \frac{d \cdot E}{k}. \qquad (3)$$

Pe tamburul fotometrului Pulfrich, prin rotirea căruia se schimbă gradul de diafragmare, sînt însemnate, în mod frecvent, diviziuni logaritmice, care exprimă direct valoarea extincției.

Folosindu-se valoarea E, citită (de exemplu, pentru o probă „a", extincția a fost de 0,62) și cunoscîndu-se constanta d_1 pentru substanța respectivă, de exemplu 12,4, se poate calcula concentrația substanței în proba de analizat după formula (4):

$$C = \frac{12{,}4 \times 0{,}62}{y}, \qquad (4)$$

unde y este grosimea stratului de substanță (cuva utilizată) exprimată în cm.

Deoarece constanta d_1 nu este cunoscută pentru toate substanțele a căror dozare este necesară, pentru calcularea concentrației substanței analizate în probă se recurge la un procedeu mai comod și rapid — construirea curbei etalon. În acest scop se folosesc probe etalon în care concentrația substanței analizate este diferită și cunoscîndu-se valoarea E se construiește curba etalon.

Pentru calcularea conținutului proteinelor în serul sanguin, după metoda Robinson-Hogden bazată pe reacția biuretului, se construiește o curbă etalon, obținută prin citirea la aparat a reacției de culoare a unei serii de probe în care cantitatea de azot variază (v. tabela 7).

Tabela 7

Construirea curbei etalon pentru determinarea cantitativă a proteinelor prin metoda Robinson-Hogden

Reactivi (ml)	Eprubeta				
	1	2	3	4	5
Peptonă, soluție 1%	0,50	1,00	1,50	2,00	2,50
Apă distilată	2,00	1,50	1,00	0,50	0,00
Hidroxid de sodiu, soluție 3%	4,50	4,50	4,50	4,50	4,50
Sulfat de cupru, soluție 10%	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
Probele sînt centrifugate la 4 000—5 000 ture/minut și partea alicotă este folosită pentru citirea la fotocolorimetrul Pulfrich					
Concentrația N_2 în probă, exprimată în grame	0,0008	0,0016	0,0024	0,0032	0,0040

Probele etalon (1—5) sînt tratate identic cu probele cu ser (v. mai sus) și citite la fotometru în decursul primelor 30 de minute. Pentru citirea probelor la fotometrul Pulfrich este necesar să se selecționeze filtrul corespunzător (la care absorbția pentru proba colorată și cuva utilizată este maximă și corespunde unei microregiuni din spectrul vizibil). De regulă, în literatura de specialitate, numărul și culoarea filtrului sînt indicate, însă tipul fotometrului utilizat variază în funcție de dotarea materială a laboratorului. Din această cauză este absolut necesar să se verifice metoda la aparatul cu care se vor efectua cercetările, stabilindu-se prin încercări cuva și numărul filtrului necesar pentru citirea probelor.

Majoritatea substanțelor în soluții colorate au un spectru de absorbție caracteristic. Astfel, pentru probele etalon (tabela 7), maximum de

absorbție este înregistrat la lungimea de undă de 560 mμ (fig. 23), la care legea Lambert-Beer rămîne valabilă[1].

Valorile E citite pentru fiecare probă etalon și concentrația probelor etalon se înscriu într-un grafic ca în figura 24. Pe ordonată sînt înscrise valori arbitrare ale extincției (ca pe tamburul aparatului), iar pe abscisă, concentrația probelor etalon în ordinea crescîndă. Valorile *E* ale probelor etalon obținute după citirea probelor se înscriu în grafic, ținîndu-se seama de concentrația fiecărei probe și de extincția înscrisă pe ordonată. Unind punctele corespunzătoare tuturor probelor se obține o linie dreaptă, care se numește „curba etalon".

În principiu, pentru obținerea curbei etalon este necesar să se folosească rezultatele a cel puțin 2—4 citiri a fiecărei probe etalon, media rezultatelor înscriindu-se în grafic.

Calcularea cantității de proteină în proba cu ser. Fie *E* valoarea citită pentru proba cu ser egală cu 0,28. Pe graficul din figura 24 se găsește că această extincție corespunde la 0,0019 g de azot. Cantitatea de proteină în proba cu ser va fi egală cu:

$$0{,}0019 \times 6{,}25 = 0{,}0118 \text{ g proteină},$$

unde 6,25 reprezintă coeficientul de calcul (se consideră că azotul în proteine constituie în medie 16% și, prin urmare, 100 : 16 = 6,25).

Inițial, pentru dozarea proteinelor s-au recoltat 2,5 ml de ser diluat. În 100 ml de ser diluat, cantitatea de proteină va fi egală cu:

$$x = \frac{100 \times 0{,}0118}{2{,}5} = 0{,}98 \text{ g proteină}.$$

Ținînd seama de diluția serului sanguin (2,5 ml au fost diluați la 25 ml cu apă distilată și pentru dozare s-au luat 2,5 ml, deci serul a fost diluat de 10 ori) se calculează cantitatea de proteină în g%:

$$0{,}98 \times 10 = 9{,}8 \text{ g\% proteină},$$

adică în 100 ml de ser se găsesc 9,8 g de proteină.

Observații. Reacția biuretului utilizată în cazul dozării proteinelor dă o colorație stabilă timp de 4 ore. Asupra colorației influențează soluția de NaOH, care după 2 săptămîni condiționează obținerea de cifre mai ridi-

[1] Spectrul de absorbție al unei substanțe se obține cu ajutorul aparatelor optice, numite spectrofotometre. În figura 23 redăm spectrul de absorbție al probelor etalon din tabela 7, măsurat la spectrofotometrul automat Beckmann DK-2. Relația dintre intensitatea fasciculului de lumină absorbit I_a de soluție și intensitatea fasciculului de lumină incident I_i se numește absorbție. $A = \frac{I_a}{I_i}$. Valoarea inversă $\frac{I_i}{I_a}$ poartă denumirea de transmisie. Curba de absorbție a unei substanțe poate fi obținută în „absorbție" sau în „transmisie".

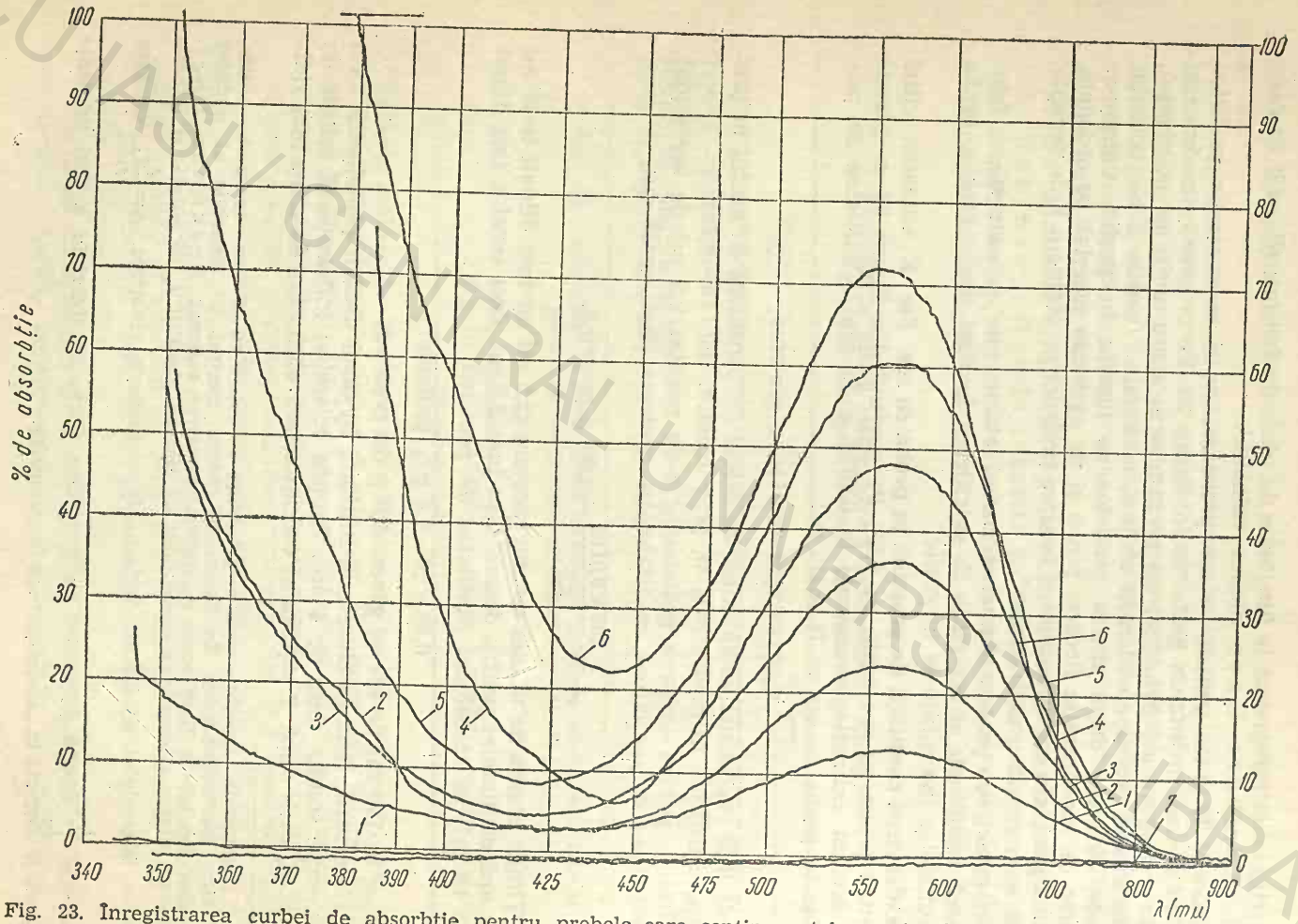


Fig. 23. Înregistrarea curbei de absorbție pentru probele care conțin proteine serice la spectrofotometrul Beckman DK-2:

1 — 0,0008 g N_2; *2* — 0,0016 g N_2; *3* — 0,0024 g N_2; *4* — 0,0032 g N_2; *5* — 0,0040 g N_2; *6* — analiza proteinelor din ser; *7* — proba martor; *8* — apă distilată.

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

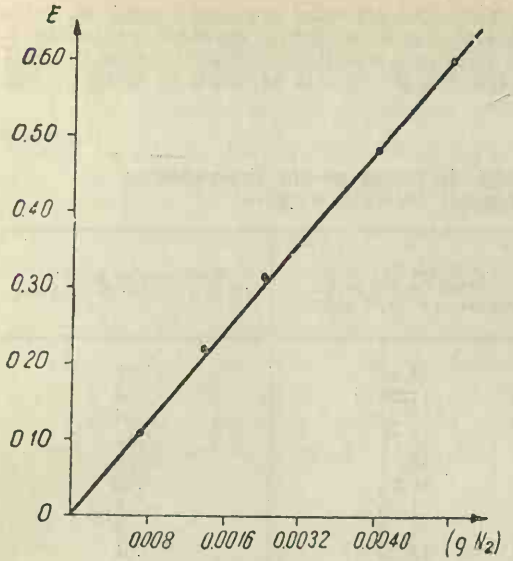


Fig. 24. Curba etalon pentru dozarea proteinelor după metoda Robinson şi Hogden. Pe ordonată sînt înscrise valorile extincţiei *E*, iar pe abscisă — concentraţia, în ordine crescîndă, a probelor etalon.

cate decît în realitate. Se recomandă prepararea soluţiei de NaOH la fiecare 10 zile şi conservarea ei în absenţa bioxidului de carbon.

Temă. Să se selecţioneze filtrul necesar pentru citirea probelor la fotometrul I.O.R. şi să se calculeze cantitatea de N_2 din probele etalon de proteină de 0,75; 1,25; 2,25 şi 2,75 ml.

1.6.6. DETERMINAREA PROTEINELOR TOTALE ÎN SERUL SANGUIN. METODA PHILLIPS, VAN SLYKE

Principiul metodei. Greutatea specifică a serului sanguin este condiţionată, în cea mai mare parte dacă nu aproape exclusiv, de cantitatea proteinelor prezente în ser. Folosindu-se soluţii de sulfat de cupru de concentraţii diferite şi deci cu greutăţi specifice diferite (1,015—1,034) se caută soluţia de sulfat de cupru în care o picătură din serul de analizat va rămîne în suspensie. În această soluţie, greutatea specifică a serului va fi egală cu greutatea specifică a soluţiei. Cunoscînd greutatea specifică a soluţiei de $CuSO_4$ se poate calcula cantitatea proteinelor totale din ser.

Reactivi necesari: 1) Soluţie stoc de sulfat de cupru, cu o greutate specifică egală cu 1,100. Se dizolvă 158,54 g $CuSO_4$ în 800 ml apă distilată, se agită energic şi după dizolvarea completă a sulfatului de cupru se aduce la un litru cu apă distilată.

Greutatea specifică a soluţiei se verifică cu ajutorul areometrului. Soluţia stoc se conservă în frigider şi poate fi folosită pentru prepararea soluţiilor diluate utilizate pentru determinări şi după un timp mai îndelungat de la preparare.

2) Serie de soluții de sulfat de cupru cu greutate specifică cuprinsă între 1,015 și 1,034. Se prepară din soluția stoc după indicațiile cuprinse în tabela 8. Într-un balon cotat de 100 ml se pune cu pipeta cantitatea de soluție stoc indicată în tabelă pentru greutatea specifică respectivă și volumul se aduce la semn cu apă

Tabela 8

Prepararea soluțiilor de sulfat de cupru pentru determinarea cantitativă a proteinelor în serul sanguin[1]

Numărul flaconului	Greutatea specifică a soluției	Cantitatea de $CuSO_4$ utilizată (în ml) pentru prepararea a 100 ml soluție	Cantitatea de proteine (în %) în umorile analizate
1	1,015	14,26	3,01
2		14,76	3,20
3	1,016	15,25	3,38
4		15,75	3,57
5	1,017	16,24	3,76
6		16,74	3,95
7	1,018	17,23	4,14
8		17,73	4,33
9	1,019	18,22	4,51
10		18,72	4,70
11	1,020	19,21	4,89
12		19,71	5,08
13	1,021	20,20	5,26
14		20,70	5,46
15	1,022	21,19	5,64
16		21,68	5,83
17	1,023	22,17	6,02
18		22,66	6,21
19	1,024	23,15	6,39
20		23,65	6,58
21	1,025	24,14	6,77
22		24,63	6,96
23	1,026	25,12	7,14
24		25,61	7,33
25	1,027	26,10	7,52
26		26,59	7,71
27	1,028	27,08	7,90
28		27,57	8,09
29	1,029	28,06	8,27
30		28,55	8,46
31	1,030	29,04	8,65
32		29,52	8,84
33	1,031	30,00	9,02
34		30,50	9,21
35	1,032	31,00	9,40
36		31,50	9,59
37	1,033	32,00	9,78
38		32,50	9,97
39	1,034	33,00	10,15
40		33,50	10,34

[1] Acest tabel a fost întocmit de Phillips și colaboratorii în mod empiric.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

distilată. Soluția astfel preparată se păstrează în sticle de laborator etichetate, pe care se notează numărul flaconului și greutatea specifică a soluției de $CuSO_4$. Deoarece două soluții cu concentrații foarte apropiate au aceeași greutate specifică, însă corespund la cantități de proteină diferite (v. tabela 8), pe flacoane se va indica și ordinea acestor soluții, de exemplu, 1,018—*1*-, 1,018—*2*- etc.

Modul de lucru. Dintr-o pipetă Pasteur (sau o pipetă obișnuită cu vîrîul ușor efilat) și de la o înălțime de 0,5—1 cm deasupra soluției de sulfat de cupru, se lasă să cadă o picătură din serul de analizat. Picătura de ser în contact cu soluția de $CuSO_4$ se acoperă cu o peliculă de proteinat de cupru. Timp de 15 secunde se urmărește comportarea picăturii de ser în soluția de $CuSO_4$.

În funcție de greutatea specifică a serului sanguin, și deci de cantitatea de proteină, precum și de concentrația soluției de sulfat de cupru în care se urmărește comportarea picăturii se pot întîlni 3 cazuri:

— greutatea specifică a serului este mai mare decît a soluției de sulfat de cupru. În acest caz, picătura de ser va sedimenta pe fundul flaconului;

— greutatea specifică a serului este mai mică decît a soluției de sulfat de cupru în care a fost introdusă și picătura de ser sanguin va pluti deasupra soluției din flacon;

— ambele greutăți specifice, și a soluției de $CuSO_4$ și a serului, sînt sensibil egale; picătura de ser va rămîne suspendată în soluție aproximativ 15—20 de secunde.

Greutatea specifică a soluției de $CuSO_4$ în care s-a observat ultimul caz *c* se notează și se citește apoi în tabela 8 cantitatea de proteine totale, din serul de analizat, care este exprimată direct în g%.

O sursă de erori în determinarea cantității totale a proteinelor în serul sanguin o constituie prezența unor componente obișnuite ale serului, însă în cantități mai mari decît în mod normal, de exemplu, glucoza în diabetul zaharat și bilirubina, în cazul unor dereglări metabolice. Acești compuși influențează rezultatul determinărilor, ei mărind greutatea specifică a serului.

Dacă se determină și greutatea specifică a sîngelui total se poate determina și conținutul procentual al hemoglobinei în sînge și hematocritul, folosindu-se în acest caz nomograme special întocmite.

Metoda Phillips-van Slyke este comodă, rapidă și frecvent utilizată în laboratorul clinic. Se folosește cu succes pentru determinări în serie.

Valoarea diagnostică. În serul sanguin al pacienților normali, cantitatea de proteine totale variază între 7 și 8 g%, densitatea plasmei fiind cuprinsă între 1,024 și 1,028. O cantitate de proteine anormală (hiperproteinimia) se poate întîlni la pacienții cu diabet insipid, vomitări frecvente, diaree, în cazurile de deshidratare a organismului, în reumatism etc. În unele maladii, cantitatea de proteine crește pînă la 12 g%.

Proteinele din serul sanguin scad pînă la 4—5 g% (hipoproteinimie) în nefroze, inaniție, în cazul unor boli infecțioase, a formațiunilor maligne și, de asemenea, în ciroze.

Observații. Ca anticoagulanți în cazul recoltării sîngelui pentru determinarea cantitativă a proteinelor totale după această metodă se recomandă folosirea exclusivă a heparinei sau a oxalaților, care nu modifică greutatea specifică a plasmei obținute după centrifugarea sîngelui și nu influențează rezultatul determinărilor.

1.6.7. DETERMINAREA ALBUMINELOR ȘI GLOBULINELOR DIN SERUL SANGUIN. METODA KINGSBEY

Principiul metodei. Proteinele, în mediu alcalin și în prezența sulfatului de cupru, formează un complex de culoare roșie-purpurie (reacția biuretului). Globulinele sînt precipitate cu ajutorul unei soluții de sulfat de sodiu și albuminele rămase în soluție sînt dozate colorimetric. Diferența dintre cantitatea totală de proteine și cantitatea de albumine reprezintă fracția globulinelor.

Reactivi necesari: 1) Sulfat de cupru, soluție 20%; 2) Hidroxid de sodiu, soluție 3%; 3) Hidroxid de sodiu, soluție 1,8%; 4) Sulfat de sodiu, soluție 22,2%.

Modul de lucru.

1.6.7.1. Determinarea proteinelor totale

Se pune cu pipeta într-o eprubetă de centrifugă în conus 0,1 ml de ser sanguin, 8 ml de soluție 3% de NaOH, 0,3 ml de soluție $CuSO_4$, 20% și conținutul se agită energic, iar după 5 minute se centrifughează la 3 000—4 000 turații/minut.

Supernatantul este atent decantat și probele sînt citite la fotoelectrocolorimetru, folosindu-se cuva de 2 cm și la $\lambda = 565$ mμ. Ca martor se folosește apa distilată.

Cantitatea de proteine totale din serul sanguin, exprimată în g%, este calculată după formula:

$$x = 6{,}25 \times k \times 1\,000,$$

unde:

k — reprezintă valoarea găsită în curba etalon, construită ca și în cazul metodei Robinson-Hogden;

6,25 — factor de transformare[1];

1 000 — coeficient de diluție.

[1] V. metoda Kjeldahl.

1.6.7.2. Determinarea albuminelor din ser

Într-un balon Erlenmeyer se măsoară cu o pipetă 0,5 ml de ser sanguin și 15 ml de soluție de Na_2SO_4 22,2%. Conținutul balonului se agită energic și se menține timp de 3 ore la 37°C pe o baie de apă sau într-un termostat.

După 3 ore probele sînt filtrate și 3,1 ml din filtratul obținut sînt trecuți într-o eprubetă de centrifugă, în care se adaugă 5 ml de soluție de NaOH 3% și 0,3 ml de soluție de $CuSO_4$ 20%. Conținutul eprubetei de centrifugă se agită energic și se lasă în repaus timp de 10 minute, după care amestecul este centrifugat la 5 000 turații/minut.

Probele sînt citite la fotoelectrocolorimetru, folosindu-se cuva de 2 cm și filtrul corespunzător la $\lambda = 565$ mμ. Soluția de comparare (martorul) constă din 3,1 ml de soluție de Na_2SO_4, 22,2%, 5 ml de soluție de NaOH, 4,8% și 0,3 ml de soluție de $CuSO_4$, 20%. Calculul rezultatelor se realizează ca în cazul determinării proteinelor totale.

1.6.7.3. Determinarea globulinelor din ser

Cantitatea de globuline din ser, exprimate în g%, reprezintă diferența dintre cantitatea de proteine totale și concentrația albuminelor din ser.

Valoarea diagnostică. În plasma pacienților normali, conținutul procentual relativ al fracției albuminelor este de 35—65% (3,8—5,2 g%), iar al globulinelor, de 21—47% (2,2—3,8 g%). Hipoalbuminemia se întîlnește în bolile cronice ale ficatului și ale tractului gastro-intestinal, în maladiile infecțioase și în hemoragii. Cantitatea globulinelor în plasma sanguină crește în leucoze, infecții cronice etc.

1.6.8. SEPARAREA FRACȚIILOR PROTEICE DIN SERUL SANGUIN. METODA ELECTROFOREZEI PE HÎRTIE

Studiul proteinelor din serul sanguin, efectuat în trecut prin metoda clasică a electroforezei optice, propusă de Tiselius, a devenit accesibil numai datorită perfecționării acestei metode și a apariției electroforezei pe hîrtie, pe gel de amidon etc.

În serul sanguin sînt prezente peste 40 de proteine diferite care au fost izolate cu ajutorul celor mai diverse metode. Electroforeza pe hîrtie permite separarea proteinelor din ser în 5 grupe de bază: albumine, albumine α_1, albumine α_2, β-globuline și γ-globuline.

Electroforeza pe hîrtie este o metodă relativ ușoară și exactă, mai puțin costisitoare ca aparatură în comparație cu metoda clasică Tiselius și care are o mai largă utilizare în clinica medicală și în cercetare.

Principiul metodei. Particulele coloidale proteice, purtătoare de sarcini electrice, sînt mobile în soluție și într-un cîmp electric, aplicate

pe o hîrtie de filtru cufundată într-o soluţie tampon, migrează cu viteze diferite către electrodul cu sarcina electrică contrară sarcinii lor. Viteza de migrare depinde de concentraţia ionilor de hidrogen din soluţia tampon şi de intensitatea curentului aplicat pentru crearea cîmpului electric.

Reactivi necesari: 1) Soluţie tampon veronal — medinal. Se dizolvă 10,32 g de medinal (sare de sodiu a veronalului) în 300 ml de apă bidistilată, la care se adaugă 1,84 g veronal. Amestecul se încălzeşte pe o baie de apă pînă la dizolvarea completă a reactivilor. Se aduce la un volum final de 1 l cu apă bidistilată. 2) Hidroxid de sodiu, soluţie 10%; 3) Albastru de bromfenol. Se dizolvă 0,05 g albastru de bromfenol în aproximativ 50 ml de apă distilată şi se adaugă 2 g de $HgCl_2$ şi 2 ml de acid acetic glacial. Volumul se aduce la 100 ml cu apă distilată; 4) Acid acetic, soluţie 1% şi 2%; 5) Amidoschwarz, soluţie saturată preparată în alcool metilic care conţine 10% acid acetic; 6) Alcool metilic; 7) Azocarmin B. Se prepară un amestec din 10 ml acid acetic glacial, 90 ml de apă distilată şi 100 ml de alcool metilic în care se dizolvă azocarmin B pînă la obţinerea unei soluţii saturate a colorantului; 8) Hîrtie cromatografică, Whatman nr. 1.

Descrierea şi pregătirea camerei de electroforeză. În prezent se utilizează diferite tipuri de camere de electroforeză şi de aceea se va descrie schema unei camere tipice de electroforeză (fig. 25).

În cuvele 1 şi 2 se introduc volume egale de soluţie tampon-veronal-medinal de sodiu sau de soluţie tampon de fosfaţi — pH=8,6—8,71 şi forţa ionică 0,05—0,1. Pentru separarea electroforetică a proteinelor serice se utilizează benzi de hîrtie cromatografică Whatman nr. 1. Dimensiunile benzilor, de regulă, sînt cuprinse între 3 şi 5 cm lăţime şi 35—40 cm lungime şi sînt adaptate pentru camera de electroforeză care se utilizează. Pe banda de hîrtie cromatografică se notează la una din extremităţi punctul care marchează jumătate din lăţime şi la cealaltă extremitate, condiţiile experimentale în care se realizează experienţa. Adnotările se fac întotdeauna cu creioane cu grafit negru.

Hîrtia cromatografică este umectată cu ajutorul soluţiei tampon care se va utiliza pentru electroforeza proteinelor şi după aceea uscată la temperatura camerei. La partea în care s-a notat punctul central al benzii şi la o distanţă de 5 cm de la capătul hîrtiei se aplică cu ajutorul unei micropipete 0,025 ml de ser sanguin.

După aceea, hîrtia cromatografică se aşază în camera de electroforeză în aşa fel încît capătul hîrtiei la care a fost aplicat serul sanguin să fie îndreptat către anod şi ambele extremităţi ale acesteia să fie cufundate în soluţie.

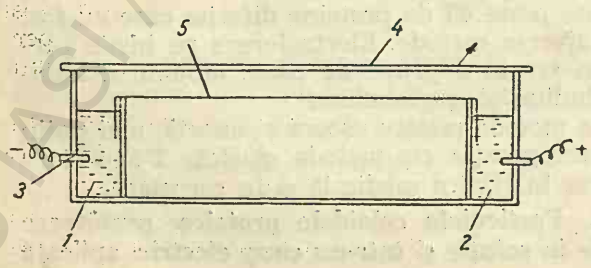


Fig. 25. Schiţa aparatului de electroforeză:
1, 2 — cuve pentru soluţiile tampon; *3* — electrozi de platină; *4* — placă de sticlă; *5* — hîrtie cromatografică.

Volumul de ser sanguin aplicat pe hîrtia cromatografică umectată și uscată poate varia în funcție de scopul urmărit: 0,02; 0,01; 0,005 ml și aplicarea lui, de regulă efectuată cu ajutorul micropipetei, se poate realiza și cu ajutorul unei bucăți de sticlă șlefuită, lată de aproximativ 1,3—1,5 cm.

Picătura de ser sanguin este aplicată pe sticlă, după care aceasta se manipulează ușor în așa fel încît latura ei cea mai îngustă să fie îndreptată spre hîrtia cromatografică. Atingînd suprafața hîrtiei sub un unghi ascuțit se menține în aceeași poziție timp de 10—20 de secunde, după care obiectul de sticlă se îndepărtează.

Camera de electroforeză se acoperă, iar pe suprafața internă a plăcii folosită în acest scop se fixează o foaie de hîrtie de filtru pentru a capta vaporii de apă, care se condensează pe suprafața acestei plăci.

Separarea electroforetică a proteinelor se realizează în decurs de 6—24 ore la un potențial de 3—8 V pentru fiecare centimetru parcurs de curentul electric. În scopul reglării condițiilor corespunzătoare pentru fiecare caz în parte se utilizează redresori de curent, cu un voltaj variabil între 110 și 320 V, prevăzuți cu aparate de măsură a intensității și forței curentului. Acești doi parametri sînt variabili în funcție de natura și *p*H-ul soluției tampon, de lungimea și lățimea hîrtiei cromatografice utilizate, de calitatea acesteia, de grosimea ei și de temperatura la care se realizează separarea proteinelor. Dacă aparatul este prevăzut pentru mai multe benzi cromatografice, intensitatea curentului este în funcție de numărul acestora. Este contraindicată folosirea unui curent mai puternic, deoarece în acest caz are loc o creștere a temperaturii hîrtiei și o evaporare mai intensă a soluției tampon.

Rezultate foarte bune se obțin la temperaturi cuprinse între 3 și 10°C. În condițiile de temperatură ale laboratorului (18—25°C), rezultatele separării proteinelor prin această metodă sînt mulțumitoare.

Developarea cromatogramelor. Imediat după terminarea electroforezei, benzile cromatografice sînt introduse, pentru 5 minute, într-un termostat la 80—90°C. Developarea lor după aceea se poate realiza în mod diferit.

Electrograma este introdusă timp de 10 minute într-o soluție de Amidoschwarz 10 B, după care este spălată cu soluție de alcool metilic care conține acid acetic (10%). Excesul de colorant este apoi îndepărtat prin spălarea electroforegramei într-o cuvă plină cu apă distilată și apoi cu soluție de alcool metilic care conține acid acetic. Electroforegrama se consideră bine spălată de excesul de colorant cînd suprafața pe care nu s-au fixat proteinele este perfect incoloră. După aceea electroforegramele sînt uscate la temperatura camerei.

Electroforegramele, după uscarea în termostat, sînt cufundate pentru 5 minute într-o baie cu albastru de bromfenol. Excesul de colorant este îndepărtat prin spălarea electroforegramelor cu soluție de acid acetic 2%. Operația de eluare a electroforegramei se consideră terminată cînd hîrtia cromatografică devine albă, iar soluția de acid acetic nu se mai colorează în galben.

Developarea electroforegramelor se poate realiza şi cu ajutorul unei soluţii de azocarmin B, cînd cromatogramele sînt introduse pentru 15 minute în soluţia colorantului şi ulterior pentru fixarea acestuia în spoturile proteinelor, electroforegrama se cufundă în alcool metilic. Excesul de colorant este îndepărtat prin spălarea electroforegramelor cu soluţie de alcool metilic care conţine acid acetic (1%)[1].

Citirea electroforegramelor. După developare, pe benzile de hîrtie cromatografică apar, de cele mai multe ori, patru spoturi, care corespund albuminelor, α-albuminelor, β- şi γ-globulinelor. La *p*H=8,6, aceste proteine migrează în direcţia anodului, deoarece în condiţiile experimentale de mai sus, ele posedă sarcini electronegative. Viteza de migrare este diferită şi în ordinea distanţei faţă de anod sînt repartizate astfel: albumine, α-globuline, β-globuline şi γ-globuline. γ-globulinele se găsesc pe „linia de start", în locul aplicării serului sanguin şi uneori chiar uşor deplasate spre catod. Această migrare spre catod se datoreşte faptului că în timpul electroforezei, în hîrtia cromatografică se realizează un curent al soluţiei tampon orientat de la anod la catod, curent care antrenează proteinele respective (γ-globulinele) înspre catod. Acest fenomen, denumit curent electroosmotic, depinde de calitatea hîrtiei cromatografice utilizate, de intensitatea curentului şi de *p*H-ul soluţiei tampon.

Determinarea raportului cantitativ dintre diferite fracţii de proteine. Spoturile fracţiilor proteice sînt decupate din electroforegramă. Hîrtia cromatografică corespunzătoare spotului respectiv este tăiată în bucăţele mici şi introdusă într-o eprubetă.

În fiecare eprubetă care corespunde unei fracţii proteice se măsoară cu pipeta 10 ml soluţie de NaOH *N*/10 şi probele sînt lăsate în repaus timp de 1 oră, agitîndu-se din timp în timp. Dacă unele spoturi sînt colorate intens, de exemplu, spotul care corespunde fracţiei albuminelor, atunci se adaugă 20 ml de soluţie NaOH *N*/10.

Intensitatea coloraţiei rezultate după eluţia probelor este citită la fotocolorimetru FEK-N-57, folosindu-se filtrul S-57 şi o cuvă de 2 cm grosime.

Calculul rezultatelor. Suma extincţiilor (*E*) citite pentru fiecare fracţie proteică în parte se consideră 100%. Dacă s-au utilizat, pentru eluţia unei fracţii, 20 ml de NaOH *N*/10, extracţia se dublează pentru fracţia respectivă. Conţinutul procentual al fiecărei fracţii se calculează după formula:

$$\frac{E_{\text{fracţie}} \times 100}{\text{Suma extincţiilor}} = \text{conţinutul procentual relativ al fracţiei.}$$

În tabela 9 se redă raportul cantitativ dintre diferite fracţii proteice separate prin metoda electroforezei pe hîrtie din serul şi plasma sanguină a omului şi animalelor.

[1] Se va realiza developarea cromatogramelor cu diferiţi coloranţi şi se vor compara rezultatele.

Tabela 9

Raportul cantitativ dintre diferite fracţii proteice, separate prin metoda electroforezei pe hîrtie (exprimat în g% faţă de proteine totale)

Fracţia proteică	Ser uman	Ser de şobolan	Plasmă sanguină de iepure	Plasmă sanguină de cîine	Plasmă sanguină de maimuţă
Albumine	60,3	41,5	63,0	36,3—47,4	50,0
α-globuline	11,8	—[1])	11,5	6,3— 9,4	14,9
β-globuline	12,1	9,3	13,0	12,2—17,7	16,1
γ-globuline	11,0	6,3	4,3	7,3—11,4	9,0

[1]) Nu întotdeauna această fracţie este prezentă în serul sanguin de şobolan.

1.6.9. DETERMINAREA ACIZILOR NUCLEICI ÎN MATERIALUL BIOLOGIC. METODA SCHMIDT ŞI THANNHAUSER

Principiul metodei. Stabilitatea diferenţiată a acizilor nucleici în mediu alcalin creează posibilitatea separării şi determinării lor cantitative prin dozarea fosforului anorganic eliberat după hidroliză.

Reactivi necesari: 1) Acid tricloracetic, soluţii 7%; 5%; 1%; 2) Alcool etilic 96%; 3) Cloroform; 4) Alcool metilic; 5) Hidroxid de potasiu, soluţie 1*N*; 6) Reactivi pentru determinarea fosforului (v. metoda Fiske-Subbaron); 7) Acid clorhidric, soluţie 6*N*; 8) Amoniac, soluţie concentrată; 9) Clorură de calciu, soluţie 2,5%; 10) Carbonat de magneziu, suspensie în apă 0,5%; 11) Amoniac, soluţie 2% saturată cu fosfat tricalcic; 12) Acid percloric, soluţie 60%.

Modul de lucru. Se cîntăresc la balanţa de torsiune (fig. 26) probe de ţesut, cuprinse între 0,5 şi 5 g care sînt introduse imediat în 5 ml de soluţie de acid tricloracetic 7%. Probele se ţin la rece (în frigider) şi sînt agitate permanent, cu ajutorul unui agitator magnetic, timp de 20 de minute, după care sînt centrifugate. Partea alicotă este îndepărtată prin decantare, iar precipitatul este spălat de 2 ori cu soluţie de acid tricloracetic 1%, apoi cu apă distilată răcită pînă cînd reacţia apelor de spălare nu mai este acidă (se controlează cu ajutorul hîrtiei de turnesol). După aceea, precipitatul este spălat cu alcool etilic absolut şi cu eter etilic pur. În decursul acestor operaţii, întreaga cantitate de fosfor acidosolubil este extrasă cu ajutorul acidului tricloracetic şi îndepărtată. Reziduul este tratat în continuare cu un volum de 30—40 ori mai mare de amestec alcool etilic absolut — eter etilic 3 : 1 (în funcţie de cantitatea de ţesut recoltată pentru analize se stabileşte volumul de amestec care se va utiliza). Reziduul se trece cu ajutorul amestecului alcool etilic-eter (3 : 1) într-un balon cu fund rotund, prevăzut cu un refrigerent cu reflux şi este extras prin fierbere timp de cîteva minute (fig. 27). Soluţia etero-

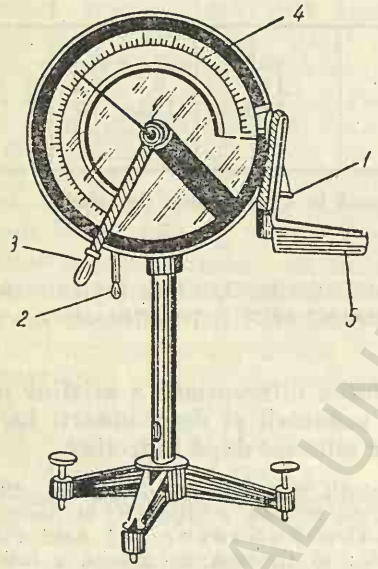


Fig. 26. Balanța de torsiune:
1 — caretă pentru recoltarea eșantioanelor; *2* — tija de deschidere și de blocare a balanței; *3* — manetă pentru echilibrarea balanței în timpul cîntăririi; *4* — cadranul gradat care indică greutatea eșantioanelor; *5* — dispozitiv de protejare a careței și a eșantionului în timpul tarării.

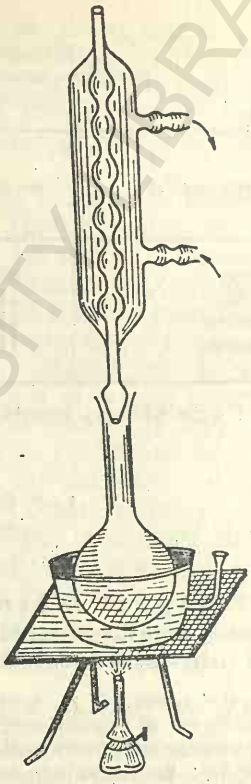


Fig. 27. Instalație de extracție a materialului biologic, prevăzută cu refrigerent cu reflux.

alcoolică se filtrează, iar precipitatul se spală pe filtru cu eter. Precipitatul este ulterior mojarat și tratat cu un volum de 30—40 ori mai mare de amestec de alcool metilic și cloroform 1 : 1 pentru extragerea componentelor de natură lipidică. În acest scop, extracția lipidelor prezente în precipitat se realizează prin distilarea amestecului cloroform-alcool metilic, timp de 30 de minute, într-un balon de distilare prevăzut cu un refrigerent cu reflux. După extracția cu alcool metilic și cloroform, soluția se filtrează și reziduul de pe filtru este spălat atent cu eter etilic și uscat într-un exicator cu vacuum. Preparatul obținut, care a fost degresat, este trecut cantitativ într-un tub de centrifugă, prevăzut cu dop rodat, în care pentru fiecare gram de țesut recoltat inițial se adaugă 10 ml soluție de hidroxid de potasiu, soluție 1*N*. Tubul de centrifugă se închide ermetic cu ajutorul dopului rodat și conținutul lui este incubat în decurs

de 16—18 ore, într-un termostat reglabil, la temperatura de 37°C. La sfîrșitul perioadei de incubare, amestecul este centrifugat, 10 minute la 5 000—7 000 turații/minut, pentru îndepărtarea particulelor insolubile, și un volum definit din hidrolizat, în care urmează să se dozeze fosforul total al acizilor nucleici, este recoltat pentru mineralizare (v. metoda Fiske-Subbarow de dozare a fosforului).

În condițiile experimentale ale unei hidrolize alcaline menajate (soluție NaOH 1*N* și la temperatura de 37°), acidul ribonucleic este hidrolizat cu formare de mononucleotide, în timp ce acidul dezoxiribonucleic rămîne intact. În scopul dozării acidului ribonucleic este necesară separarea produselor rezultate în urma hidrolizei alcaline a acestuia, precum și îndepărtarea acidului dezoxiribonucleic prezent în hidrolizat.

La un volum bine definit de hidrolizat se adaugă soluție de acid clorhidric 6*N* (0,2 volume în raport cu volumul hidrolizatului utilizat) și un volum de acid tricloracetic 5% egal cu cel al hidrolizatului utilizat. În aceste condiții experimentale, proteinele și acidul dezoxiribonucleic sînt precipitate, iar în soluție rămîn pe lîngă produsele hidrolizei acidului ribonucleic, care conțin fosfor, și fosfoproteidele.

Pentru determinarea cantitativă a fosforului acidului ribonucleic se recoltează în paralel patru probe. Două probe paralele sînt mineralizate și în mineralizatele obținute se determină cantitativ fosforul acidului ribonucleic și fosforul fosfoproteidelor. Celelalte două probe paralele sînt utilizate pentru dozarea fosforului fosfoproteidelor. În acest scop, o cantitate de hidrolizat (aceeași ca și pentru primele două probe) se recoltează în tuburi de centrifugă și se neutralizează cu amoniac concentrat în prezența fenolftaleinei. După neutralizarea hidrolizatului în probe se mai adaugă cu pipeta încă 0,2 ml amoniac concentrat. La soluția alcalină astfel obținută se adaugă 1 ml $CaCl_2$, soluție 2,5% și 1 ml suspensie „ușoară" de $MgCO_3$ 0,5% (în apă). Amestecul se agită și se lasă în repaus, la rece, timp de 30 de minute. Probele sînt centrifugate, după o agitare prealabilă a conținutului lor. Partea alicotă este decantată și precipitatul este spălat cu 5 ml soluție de amoniac 2% saturată cu fosfat de calciu $Ca_3(PO_4)_2$. Probele sînt din nou centrifugate, și după îndepărtarea părții alicote, precipitatul este dizolvat în 1,1 ml de acid percloric, soluție 60%, după care probele sînt diluate cu apă distilată pînă la un volum final de 10 ml și se folosesc pentru dozarea fosforului fosfoproteidelor.

Diferența dintre cantitatea de fosfor, dozată în hidrolizatul alcalin care conținea fosforul prezent în acizii nucleici (*ARN*+*ADN*) și fosforul dozat în hidrolizatul acidulat, reprezintă fosforul acidului dezoxiribonucleic. Diferența dintre cantitatea de fosfor dozat în hidrolizatul acid și concentrația fosforului fosfoproteidelor reprezintă fosforul acidului ribonucleic.

Pentru exprimarea rezultatelor în miligrame de acid nucleic se folosesc următorii coeficienți de transformare: pentru acidul dezoxiribonucleic (*ADN*) — 10,1, iar pentru acidul ribonucleic (*ARN*) — 10,6. Acești coeficienți sînt stabiliți empiric și țin seama de conținutul procentual al fosforului în acizii nucleici respectivi.

1.6.10. DETERMINAREA ACIDULUI RIBONUCLEIC ÎN ȚESUTURILE ANIMALE. METODA WEBB

Principiul metodei. Riboza, rezultată după hidroliza acidului ribonucleic, în mediu puternic acid se transformă în furfurol. Furfurolul, extras din hidrolizatul acidului ribonucleic cu ajutorul xilolului, reacționează cu p-bromfenil-hidrazina în mediu acid, colorînd soluția în galben. Intensitatea coloratiei este direct proporțională cu concentrația ribozei în proba analizată.

Reactivi necesari: 1) Acid tricloracetic, soluții 10% și 5%; 2) Acid clorhidric, soluție 8*N*; 3) Xilol; 4) Clorură de sodiu, în preparat; 5) Reactiv clorhidrat de p-bromfenilhidrazină; 6) Hidroxid de potasiu, soluție 5*N*.

Modul de lucru. Se recoltează în tuburi de centrifugă probe de țesut, cuprinse între 25 și 100 mg, care sînt tratate de cîteva ori (2—3) cu cîte 10 ml de soluție rece de acid tricloracetic 10% în scopul îndepărtării constituenților tisulari acidosolubili. După fiecare centrifugare, supernatantul este îndepărtat prin decantare și precipitatul spălat din nou cu acid tricloracetic. Reziduul se spală în continuare cu apă distilată rece pînă la dispariția reacției acide a apelor de spălare (aproximativ 8—9 spălări cu cîte 10—15 ml de apă distilată rece). Materialul de natură lipidică prezent în reziduul obținut este extras cu alcool etilic și eter etilic. În acest scop, reziduul este trecut într-un balon cu fund rotund cu ajutorul a 15—20 ml de alcool etilic 96% și extras timp de 30 de minute, pe o baie de apă, la temperatura de fierbere a alcoolului etilic (balonul de distilare este prevăzut cu un refrigerent cu reflux). Extractul alcoolic este separat prin centrifugare, iar reziduul este extras din nou cu eter etilic, timp de 25—30 de minute. Reziduul se separă prin centrifugare și se usucă sub vacuum. Preparatul amorf este ulterior hidrolizat 30 de minute, pe o baie de apă în clocot, în prezența unei soluții de acid tricloracetic 5% (2—3 ml). Fiecare mililitru de hidrolizat diluat trebuie să conțină aproximativ 1—6 mg preparat amorf sau o cantitate echivalentă cu 9—200 mg acid ribonucleic. În paralel, pentru obținerea unei soluții standard de acid ribonucleic, se hidrolizează o probă de acid ribonucleic preparat după metoda Kunitz (v. mai jos). Soluția standard trebuie să conțină 1 mg de acid ribonucleic într-un ml de soluție. Această concentrație a soluției standard se obține prin diluția repetată, cu acid tricloracetic 5%, a soluției inițiale de acid ribonucleic.

Se pun cu pipeta cîte 1 ml de hidrolizat diluat în două tuburi separate de centrifugă. În fiecare probă se adaugă 1 ml acid clorhidric 8*N*, 1 ml xilen și clorură de sodiu, în preparat, pînă la saturarea soluției. În mod asemănător, se prelucrează și două probe recoltate din soluția standard de acid ribonucleic (1 ml de hidrolizat al acidului ribonucleic trebuie să conțină aproximativ 150 mg *ARN*), precum și două probe de control, în care hidrolizatul se înlocuiește cu 1 ml de acid tricloracetic 5%. Tuburile de centrifugă sînt acoperite cu pîlnii de sticlă cu un diametru de

5—6 cm, care sînt efilate la partea inferioară și probele se introduc pentru 3 ore într-o baie de apă în clocot. După răcirea probelor într-un curent de apă, în fiecare se adaugă cu pipeta cîte 2 ml de xilen, conținutul lor se agită energic și probele sînt centrifugate. Din stratul de xilen rezultat după centrifugare se recoltează cîte 2 ml de soluție, care se introduc în baloane cotate de 5 ml, în care, în prealabil, s-au pus cu pipeta cîte 2 ml de reactiv clorhidrat de p-bromfenil-hidrazină.

Purificarea preparatului de ARN după metoda Kunitz. Se iau 100 g de acid ribonucleic, preparat după metoda Kirby și se amestecă cu 500 ml de apă distilată. Amestecul se răcește la —20°C. După aceea la amestec se adaugă soluție de hidroxid de potasiu 5*N* pînă la obținerea unei soluții clare de acid ribonucleic, al cărui *p*H nu trebuie să depășească 6,0. După adăugarea hidroxidului de potasiu, soluția trebuie să aibă aceeași temperatură. La volumul amestecului obținut se adaugă un volum de acid acetic glacial de 5 ori mai mare și se lasă în repaus timp de 10 minute, la 20—25°C. Partea alicotă este decantată și reziduul este spălat de 2 ori cu 100 ml apă distilată și de 3 ori cu alcool etilic 95%. Reziduul (aproximativ 80—85 g) se dizolvă în 400 ml de apă distilată și se reprecipită. Noul precipitat obținut după centrifugare se spală cu apă distilată, cu alcool etilic și eter și se usucă la temperatura camerei pînă la realizarea unei greutăți constante. Randamentul metodei Kunitz este de 60%.

Probele sînt citite, după 10 minute, la spectrofotometru sau la fotoelectrocolorimetru FEK-N-57 la lungimea de undă de 450 mμ. Reacția furfurolului cu p-bromfenilhidrazina este mai specifică decît reacția cu orcină.

Prezența acidului dezoxiribonucleic în probele în care se dozează acidul ribonucleic nu influențează asupra rezultatelor. Metoda Webb este precisă și poate fi utilizată cu succes pentru dozarea acidului ribonucleic în extractele obținute din rinichi, ficat, țesut pulmonar, muscular, din drojdie de bere etc.

1.6.11. DETERMINAREA SIMULTANĂ A ACIZILOR NUCLEICI ÎN ȚESUTURILE ANIMALE ȘI VEGETALE. METODA SPIRIN

În metodele Schmidt-Thannhauser și Webb, determinarea cantitativă a acizilor nucleici se efectuează după hidroliza preparatelor obținute prin prelucrarea prealabilă a țesuturilor. Hidroliza alcalină sau acidă este absolut necesară, deoarece preparatele nehidrolizate ale acizilor nucleici, la lungimile de undă corespunzătoare regiunii ultraviolete a spectrului, au densități optice diferite, în funcție de starea de agregare a preparatului, de *p*H-ul soluției etc.

Prepararea acizilor nucleici din materialul de analizat prin tratarea acestuia cu acid tricloracetic în scopul îndepărtării componenților tisulari acidosolubili este incomodă în cazul dozării acestora prin spectrofotometria

în ultraviolet, datorită faptului că acidul tricloracetic are o absorbție maximă în regiunea 240—300 mμ. Absorbția maximă pentru preparatele de *ARN* este înregistrată la 260 mμ, iar pentru cele de *ADN*, la 268 mμ, adică în aceeași regiune care este caracteristică și pentru acidul tricloracetic. Eliminarea acestui inconvenient se poate realiza dacă acidul tricloracetic este înlocuit, în procedura de preparare a acidului ribonucleic, cu acidul percloric. Folosirea acidului percloric de către Agur și Rosen a permis perfecționarea metodei de determinare a acizilor nucleici.

Principiul metodei. Acizii nucleici sînt extrași din materialul biologic prin tratarea acestuia la cald cu soluții de acid percloric. Hidroliza acizilor nucleici cu formare de fragmente solubile este completă și extragerea lor din țesut este cantitativă și se realizează concomitent.

Modul de lucru. În mai multe tuburi de centrifugă, cu o capacitate de 20 ml, se introduc 5—10 ml de acid percloric, soluție 0,5*N* și probe de țesut a căror greutate variază între 5 și 500 mg (în funcție de cantitatea de acizi nucleici în țesuturile analizate). După agitare prudentă, probele sînt introduse într-o baie de apă în clocot, unde sînt ținute timp de 20 de minute. Ulterior, probele sînt răcite într-un curent de apă de robinet, centrifugate la 5 000—6 000 turații/minut, timp de 10 minute, și supernatantul utilizat pentru citirea probelor la spectrofotometru. Densitatea optică totală a hidrolizatului, care conține atît acid ribonucleic cît și acid dezoxiribonucleic, este în funcție de concentrația componentelor rezultate după hidroliza acizilor și de raportul cantitativ dintre cei doi acizi nucleici.

Dacă cantitatea totală a acizilor nucleici (ARN+ADN) în probele hidrolizate este mare, depășind o concentrație optimă pentru citirea la spectrofotometru, atunci probele sînt diluate cu soluție de acid percloric 0,5 *N*. Citirea probelor se realizează la două lungimi de undă diferite: $\lambda = 270$ mμ și $\lambda = 290$ mμ, folosindu-se cuve de cuarț de 10 mm grosime, lampa de hidrogen (pentru spectrofotometru), iar ca probă martor (probă oarbă), soluții de acid percloric 0,5 *N*. Diferența dintre valorile extincției citite pentru aceeași probă la cele două lungimi de undă și divizată cu indicele de 0,19 indică concentrația fosforului nucleic într-un ml de soluție (exprimată în mg).

Indicele 0,19, care reprezintă extincția specifică, este identic atît pentru *ARN* cît și pentru *ADN* și a fost găsit experimental de către Spirin care a utilizat soluții standard ale celor doi acizi în care concentrația fosforului nucleic a fost de 1 mg de fosfor într-un milimetru de soluție la grosimea stratului soluției de 10 mm ($ARN—E^{g^{P-ARN}}$ și $ADN—E^{g^{P-ADN}}$, fig. 28).

Formula utilizată pentru calcul este următoarea (1):

$$C_{g_{(P-AN)}} = \frac{D_{270} - D_{290}}{0{,}19},$$

unde:

$C_{g_{(P-AN)}}$ este concentrația fosforului nucleic, exprimată în g;

D_{270} — densitatea optică a hidrolizatului total la $\lambda = 270$ mμ;

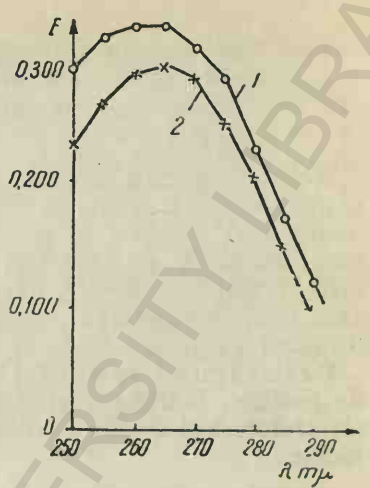


Fig. 28. Spectrul de absorbţie al preparatelor etalon de acizi nucleici:
1 — $E_{\lambda}\mu g$ (P—*ARN*); 2 — $E_{\lambda}\mu g$ (P—*ADN*);
—0—0—0 *ARN* extras din drojdia de bere;
—x—x—x *ADN* extras din timusul de vițel.

D_{290} este densitatea optică a hidrolizatului *ARN*+*ADN* la $\lambda = 290$ mμ;

0,19 — indicele extincţiei specifice.

Din figura 29 se constată că valorile *E* pentru preparatele de *ARN* şi *ADN*, cercetate pe cale experimentală în soluţii pure de acizi nucleici, nu sînt identice şi nu se suprapun. Pentru a se calcula cantitatea totală a acizilor nucleici în proba cercetată (C_{AN}) se utilizează coeficientul mediu de transformare 10,3 care se introduce în formula (2):

$$C_{AN} = 10{,}3 \times C_{F(P-AN)}.$$

Metoda Spirin poate fi utilizată cu succes şi în cazurile cînd în obiectul cercetat este prezent un singur acid nucleic, numai *ARN* sau, exclusiv, *ADN*, utilizîndu-se însă coeficienţi medii de transformare 10,5 *(ARN)* şi 10,1 *(ADN)* care rezultă din faptul că în *ARN* conţinutul procentual al fosforului reprezintă 9,5%, iar în preparatele de *ADN* — 9,9%.

Controlul determinărilor se realizează citînd *E* probelor şi la $\lambda = 260$ mμ. Extincţia la această lungime de undă este, de regulă, aceeaşi sau se încadrează în limita de ±15%. Dacă densitatea optică depăşeşte valoarea de ±15%, se recomandă tratarea hidrolizatului, la rece, cu soluţii de acid percloric 0,2*N*, pentru eliminarea impurităţilor de altă natură.

Metoda este rapidă, comodă, exactă şi se pretează la analiza în serie a probelor obţinute din diferite surse. În cazuri extrem de rare, cînd compoziţia nucleotidică a preparatelor analizate este neobişnuită, de exemplu, în cazul acizilor nucleici obţinuţi pe calea sintezei de laborator, erorile metodei cresc simţitor influenţînd negativ asupra rezultatelor experimentale.

1.6.12. ELECTROFOREZA PE HÎRTIE A ACIZILOR NUCLEICI ȘI ANALIZA CHIMICĂ A COMPOZIȚIEI LOR. METODA BROWN ȘI DIURNBAUM

Metoda separării acizilor nucleici cu ajutorul electroforezei pe hîrtie se bazează pe prezența în compoziția acestora a grupărilor libere (fosfat, amine etc.), capabile să se ionizeze. Diverse componente ale acizilor nucleici au grade de ionizare diferite, ceea ce determină și o mobilitate electroforetică deosebită. Electroforeza pe hîrtie este o metodă sensibilă care permite separarea componentelor acizilor nucleici și identificarea lor utilizînd o cantitate mică de material.

Principiul metodei. Acizii nucleici sînt extrași din materialul de analizat, hidrolizați cu formare de nucleotide care sînt separate prin electroforeză și dozate cantitativ după eluția lor cu ajutorul acidului clorhidric.

Reactivi necesari: 1) Clorură de sodiu, soluție 10%; 2) Hidroxid de potasiu, soluție 0,5*N*; 3) Acid percloric, soluție 56%; 4) Acid clorhidric, soluție 2% și 0,1*N*; 5) Soluție tampon de acetat de sodiu — acid acetic, *p*H=3,2—3,5; 6) Tetraclorură de carbon.

Modul de lucru. Probele de țesut după îndepărtarea compușilor fosforici acidosolubili și lipidelor (metoda Schmidt, Thannhauser) sînt tratate cu soluție de clorură de sodiu 10% și introduse într-o baie de apă fierbinte pentru extracția acizilor nucleici. Extragerea acizilor nucleici se realizează de 2—3 ori cu aceeași soluție. După fiecare extracție, care durează 3 ore, probele sînt centrifugate și centrifugatele reunite și răcite. Extractele sînt tratate la rece cu un volum de 2 ori mai mare de alcool etilic 96%. Precipitatul format — acizii nucleici — este separat prin centrifugare și hidrolizat în prezența hidroxidului de potasiu, soluție 0,5 *N*, în decurs de 18 ore, la 37°C. Pentru precipitarea acidului dezoxiribonucleic la soluția-hidrolizat se adaugă la rece acid percloric, soluție 56%, pînă cînd soluția are un *p*H=1,0. Hidrolizatul este centrifugat și supernatantul, care conține acid ribonucleic, este alcalinizat cu soluție de KOH pînă la *p*H=4,0. Separarea componentelor se face prin electroforeză pe hîrtie.

Precipitatul obținut după centrifugare, care conține acid dezoxiribonucleic, de asemenea, poate fi utilizat după dizolvarea lui, pentru separarea nucleotidelor prin metoda electroforezei pe hîrtie.

Prepararea hîrtiei cromatografice. Benzi mari de hîrtie cromatografică sînt tratate cu soluție de acid clorhidric 2%, spălate cu apă distilată și uscate în aer. Se decupează benzi de hîrtie lungi de 48 cm și late de 8 cm, care sînt îmbibate cu soluție tampon de acetat de sodiu sau de acid citric, 0,05—0,075 *M* și cu un *p*H=3,23—3,5. După îmbibarea hîrtiei, benzile sînt ușor tamponate cu hîrtie de filtru.

Aplicarea materialului supus separării prin electroforeză. La o distanță de 12—14 cm de la marginea benzii de hîrtie se aplică cu ajutorul unei

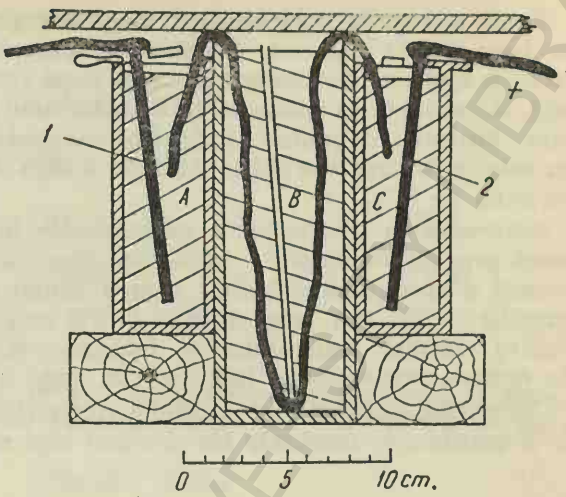


Fig. 29. Dispozitiv pentru electroforeza pe hîrtie (după Markham şi Smith, 1959):

A—C — vase de sticlă în care se introduc soluţiile tampon; *B* — vas central utilizat pentru depozitarea tetraclorurii de carbon; *1—2* — electrozi alimentaţi de la o sursă de curent continuu.

micropipete aproximativ 0,005—0,01 ml din hidrolizatul de cercetat. Volumul soluţiei-hidrolizat aplicate (—5—10 µl) trebuie să corespundă la o cantitate de nucleotide de minimum 100 µg. Concomitent, pe aceeaşi hîrtie se aplică şi probe de control cu nucleotide separate şi purificate (v. metoda descrisă mai sus).

Dispozitivul pentru separarea nucleotidelor, frecvent folosit în practica de laborator, propus de Markham şi Smith, este compus din trei vase dreptunghiulare de sticlă (fig. 29). Două din cele trei vase (*A* şi *C*) de dimensiuni mai mici (15×10×5 cm) sînt dispuse lateral faţă de vasul central *B* care este mai mare (21×12×6,5) şi servesc pentru depozitarea soluţiilor tampon. Vasul central *B* conţine tetraclorură de carbon care, în cazul de faţă, are rol de izolator (preîntîmpină încălzirea soluţiilor tampon şi uscarea electroforegramelor) între soluţiile tampon din cele două vase.

Separarea nucleotidelor. Benzile de hîrtie Watmann nr. 1 pe care au fost aplicate hidrolizatele sînt introduse în dispozitivul de electroforeză în aşa fel încît extremităţile lor să fie cufundate în soluţiile tampon din vasele *A* şi *C*, iar partea mediană a benzii de hîrtie să fie cufundată în tetraclorura de carbon din vasul *B*. Hîrtia cromatografică este fixată cu ajutorul unei baghete de sticlă (fig. 29).

În vasele *A* şi *C* se introduc electrozii de platină şi dispozitivul de electroforeză este acoperit cu o placă de sticlă, iar electrozii sînt conectaţi la o sursă de curent continuu. La o tensiune de 20 v/cm şi o intensitate de 5—30 mA (în funcţie de molaritatea soluţiei tampon aceste coordonate pot varia de la caz la caz), separarea completă a nucleotidelor se realizează după electroforeza amestecului în decurs de 2—2½ ore.

După separarea nucleotidelor, electroforegramele sînt uscate sub nișă la temperatura camerei. Localizarea spoturilor pe electroforegrame se face cu ajutorul densitometrului sau după citirea lor la lumină ultravioletă, delimitîndu-se spoturile cu ajutorul unui creion negru cu grafit obișnuit. Spoturile delimitate astfel sînt decupate și nucleotidele sînt eluate cu soluție de acid clorhidric 0,1 *N* în decurs de 16—20 de ore și la temperatura de 37°C.

Determinarea cantitativă a nucleotidelor în eluatele obținute se realizează prin citirea eluatelor la diferite lungimi de undă în regiunea ultravioletă a spectrofotometrului: pentru acidul adenilic — 258 mμ; acid guanilic — 257 mμ, acid citidilic — 278 mμ și acid uridilic — 262 mμ. Pentru calculul rezultatelor se folosesc coeficienții extincțiilor molare (în ordinea nucleotidelor indicate mai sus): 13 900; 11 800; 12 700; 9 900.

Compoziția nucleotidică a acidului ribonucleic din materia albă și cenușie a emisferelor cerebrale (de șobolan) este redată în tabela 10.

Tabela 10

Compoziția nucleotidică a *ARN* extras din emisferele cerebrale de șobolan[1]

Țesutul	Durata extracției țesutului cu NaCl, soluție 10% (ore)	Conținutul nucleotidelor în % molare					Raportul dintre nucleotide	
		Adenină (*A*)	Guanină (*G*)	Citozină (*C*)	Uracilul (*U*)	Purine / Pirimidine	*A+C* / *G+U*	*G+C* / *A+U*
Materia albă	3	20,0	31,9	26,9	20,9	1,08	0,88	1,44
Materia cenușie	3	21,4	32,6	24,4	21,4	1,09	0,85	1,33

[1] După datele lui Brown și Diurnbaum (1961).

1.7. PRODUȘI FINALI AI METABOLISMULUI

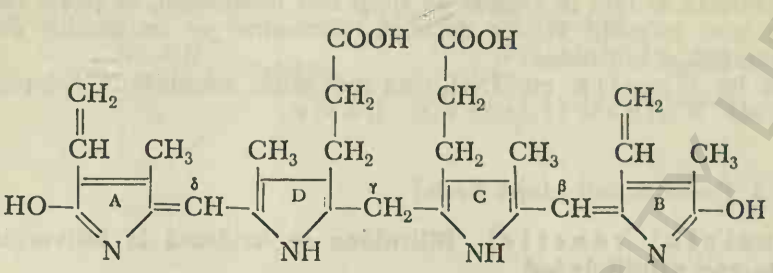
1.7.1. IDENTIFICAREA BILIRUBINEI ÎN URINĂ

1.7.1.1. Proba cu albastru de metilen (după Kalk și Wildhirt)

Bilirubina se formează în ficat, splină și, probabil, în eritrocite. Bilirubina este pigmentul cel mai important al bilei omului și animalelor omnivore și se formează prin degradarea hemoglobinei, care pierde fierul și al cărui nucleu porfirinic este scindat.

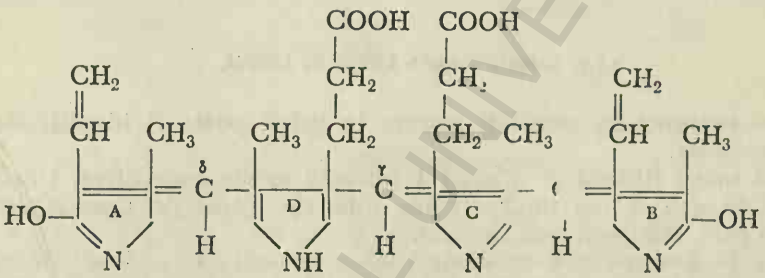
BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Bilirubina apare în urină în cazuri patologice (icter hemolotic și icter prin obstrucție), fiind absentă în urina normală.



Bilirubina

Principiul reacției. Bilirubina de culoare roșie-brună în prezența albastrului de metilen se oxidează trecînd în biliverdină, de culoare verde.



Biliverdina

Modul de lucru. Într-o eprubetă curată se măsoară cu pipeta 5 ml de urină proaspăt recoltată și se adaugă 2—3 picături soluție de albastru de metilen 0,25%. Apariția unei colorații verzi indică prezența bilirubinei și reacția este considerată pozitivă.

Proba Kalk și Vildhirt este deosebit de sensibilă în comparație cu alte metode folosite în scopul identificării bilirubinei în urină. Proba cu albastru de metilen este pozitivă chiar și în cazul cînd concentrația bilirubinei în urină este de 1 mg%. Reacția este adesea pozitivă chiar și atunci cînd urina conține numai urme de bilirubină.

1.7.1.2. Proba cu acid azotic (după Gmelin)

Principiul reacției. Oxidarea bilirubinei în biliverdină se realizează cu ajutorul acidului azotic concentrat care conține urme de acid azotos.

Modul de lucru. Se pune cu pipeta într-o eprubetă 1 ml de urină și apoi în porții mici pe pereții eprubetei, o cantitate egală de acid azotic

concentrat, evitîndu-se amestecarea celor două lichide. La limita de separare dintre urină şi acidul azotic apare un inel de culoare verde-închis. Dacă eprubeta se lasă în repaus un timp mai îndelungat, se poate observa apariţia unei coloraţii violete datorită bilicianinei — un produs de oxidare înaintată a bilirubinei.

Proba lui Gmelin cu HNO_3 este mai puţin sensibilă în comparaţiile cu probele Kalk-Wildhirt şi Rosin.

1.7.1.3. Proba cu iod (după Rosin)

Principiul reacţiei. Bilirubina se oxidează la biliverdină în prezenţa unei soluţii de iod.

Modul de lucru. Într-o eprubetă curată se pun cu pipeta 10 ml de urină. Pe peretele eprubetei se adaugă apoi 5 ml de soluţie de iod 1%. La limita de separare apare un inel de culoare verde, ceea ce indică prezenţa biliverdinei în urină.

1.7.2. IDENTIFICAREA UREEI ÎN URINĂ

Ureea prezentă în cantităţi masive în urină poate fi identificată prin două procedee:

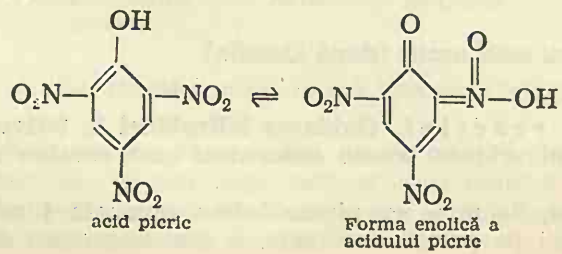
— La urina filtrată se adaugă 1 ml acid azotic concentrat. Ureea este precipitată sub forma unor cristale albe de nitrat de uree ($CO(NH_2)_2 \cdot HNO_3$) care sedimentează imediat.

— La 1—2 ml de uree se adaugă 0,6 g de acid oxalic dizolvate în 7 ml de apă. După o agitare puternică, oxalatul de uree ($2CO(NH_2)_2 \cdot H_2C_2O_4$) cristalizează.

Temă. Să se facă reacţiile specifice pentru uree cu acid azotic şi oxalat de amoniu, folosind 0,5 g preparat de uree dizolvate în 3 ml de apă distilată.

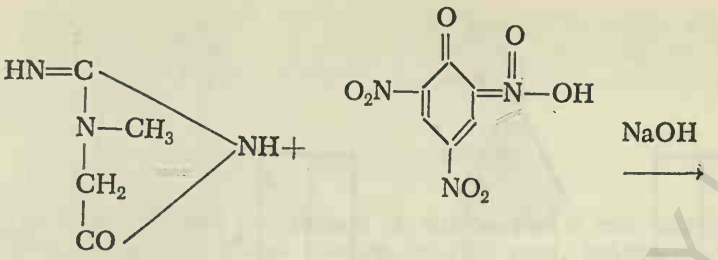
1.7.3. DETERMINAREA CREATININEI. METODA FOLIN-WU

Principiul metodei. Se bazează pe reacţia Jaffe. Creatinina în mediu alcalin reduce acidul picric la acid picramic de culoare roşie-portocalie (1), (2):

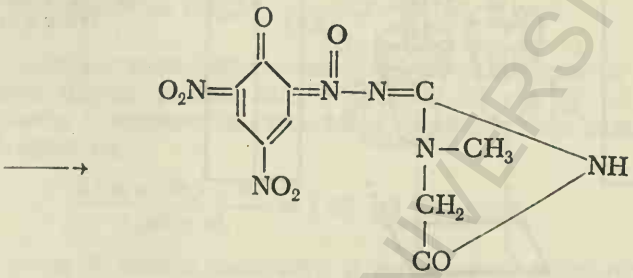


acid picric — Forma enolică a acidului picric

(1)



Creatinină



Picratul de creatinină (2)

Reactivi necesari: 1) Acid picric (recristalizat din benzen), soluție 1% în apă distilată. Soluția de acid picric se prepară încălzindu-se ușor pe o baie de apă pentru dizolvarea completă a reactivului. În final se amestecă 100 ml de soluție de acid picric 1% și 100 ml de soluție de NaOH 10% și volumul se aduce la 1 l cu apă distilată; 2) Hidroxid de sodiu, soluție 10%; 3) Creatinină, soluție etalon care conține 1 mg de creatinină într-un mililitru de soluție. Se dizolvă 1 g de creatinină în 1 l de soluție de HCl 0,1 *N*.

Modul de lucru. Într-un balon cotat de 100 ml se măsoară cu pipeta 10 ml de urină, 10 ml de apă distilată și 20 ml de soluție de acid picric 1%. Proba martor se realizează punîndu-se cu pipeta 20 ml de soluție standard de creatinină și 20 ml de soluție de acid picric 1% într-un balon cotat. După 15 minute ambele probe se aduc la semn (100 ml) cu apă distilată și se citesc la colorimetrul Duboscq (fig. 30).

Citirea probelor la colorimetrul Duboscq. Un volum determinat din proba martor și din soluția de analizat (în funcție de mărimea cuvelor cu care este dotat colorimetrul) se trece în cele două cuve-pahar (c și c_1) confecționate din sticlă groasă incoloră. Colorimetrul Duboscq se instalează pe o masă de lucru bine luminată și oglinda-reflector sau oglinda-mată S a aparatului se fixează în poziția corespunzătoare unei iluminări optime a cîmpului vizual din ocularul O al aparatului. Lumina care pătrunde prin partea inferioară a cuvelor-pahar traversează soluțiile (martorul și proba de cercetat) cele două prisme (p și p_1) și prisma romboidală P, pătrunzînd ulterior în ocularul aparatului. Cîmpul vizual, în ocularul aparatului, este divizat în două semicercuri colorate diferit datorită

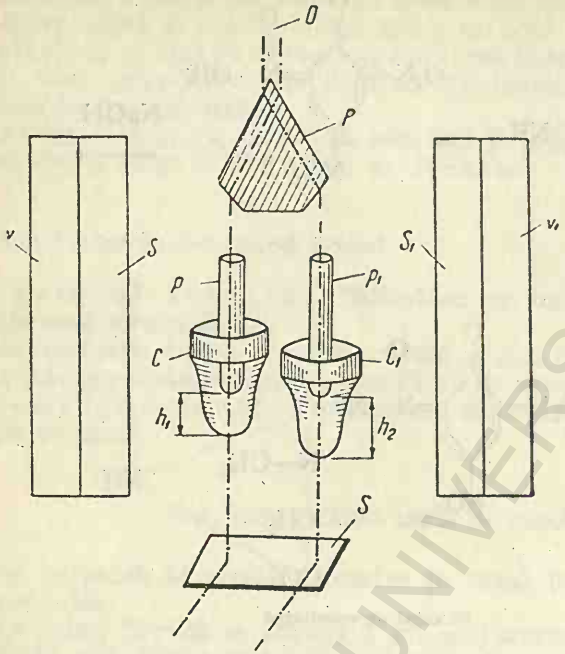


Fig. 30. Colorimetrul Duboscq.

diferenței de concentrație dintre cele două soluții. Deoarece razele luminoase, traversînd prisma romboidală *P*, se întrepătrund, coloraţia corespunzătoare cuvei-pahar din dreapta va fi vizibilă în semicercul stîng al ocularului şi invers (coloraţia cuvei-pahar din stînga apare în semicercul drept). Pentru egalarea coloraţiei celor două semicercuri ale cîmpului vizual, cuvele-pahar sînt ridicate sau coborîte cu ajutorul vernierelor (v şi v_1), evitîndu-se însă intercalarea unui strat de aer între prismele (p şi p_1) aparatului şi soluţiile de cercetat.

Se stabileşte cu ajutorul vernierului o înălţime arbitrară, fie h_1, pentru proba martor şi se notează, de exemplu, $h_1=8$ mm. Manipulîndu-se vernierul corespunzător prismei cufundate în soluţia de cercetat se egalează intensitatea coloraţiei celor două semicercuri din cîmpul vizual al aparatului. Înălţimea la care se află prisma corespunzătoare soluţiei analizate se citeşte pe scală cu ajutorul dispozitivului denumit „nonius", care nu se deplasează împreună cu vernierul. Se citeşte întregul, care se găseşte în dreptul diviziunii zero (0) de pe nonius, iar pentru citirea primei zecimale se caută o diviziune de pe nonius (fiecare diviziune corespunde la 0,09 mm) care corespunde exact unei diviziuni de pe vernierul aparatului. Înălţimea pentru proba de cercetat a fost, de exemplu, 10,20 mm. Se notează înălţimea, $h_2=10{,}2$, şi citirea probei se repetă de 2 ori, folosindu-se aceeaşi înălţime h_1 pentru proba martor. Se face media celor trei citiri.

Dacă se notează cu C_x — concentrația substanței în proba de cercetat, C_m — concentrația substanței în proba martor, iar înălțimile citite la colorimetrul Duboscq, cu h_x și respectiv h_m, după legea Lambert-Beer se poate scrie relația:

$$\frac{C_x}{C_m} = \frac{h_m}{h_x} \text{ sau } C_x = \frac{C_m \cdot h_m}{h_x}.$$

Calcularea concentrației creatininei în urină. Fie 8 mm înălțimea h_m, stabilită arbitrar pentru proba martor, și 10,2 mm, înălțimea h_2, citită pentru proba cu urina de analizat. Concentrația creatininei în probă va fi:

$$\text{Creatinină (mg)} = \frac{8}{10,2} \cdot 0,2 = 0,156 \text{ mg/ml},$$

unde 0,2 reprezintă concentrația creatininei în proba martor (20 ml de soluție standard diluați la 100 ml), exprimată în mg la ml de soluție standard de lucru. Concentrația creatininei în urină, exprimată în grame la litru, va fi egală cu:

$$\frac{0.156 \times 100 \times 1\,000}{1\,000 \times 10} = 1,56 \text{ g/l de urină.}$$

Creatinina poate fi dozată cantitativ și cu ajutorul fotometrului Pulfrich, pentru care este necesară construirea unei curbe etalon. În acest scop, 5 ml de soluție standard stoc se diluează la 100 ml cu apă distilată. În baloane cotate de 100 ml se măsoară cu pipeta cîte 1, 2, 3, 4 și 5 ml de soluție standard diluată și apă distilată pînă la 20 ml, adică respectiv 19, 18, 17, 16 și 15 ml de apă distilată. La fiecare probă etalon de lucru se adaugă 20 ml de soluție alcalină de acid picric 1% și după 15 minute, volumul probelor se aduce la 100 ml cu apă distilată. Probele sînt citite la fotometru la $\lambda = 520$ mμ. Valorile E și concentrația probelor se înscriu într-un sistem de coordonate pentru obținerea curbei etalon.

Creatinina se dozează în 1 ml de urină și calculul rezultatelor se realizează ținîndu-se seama de diluarea probei de urină, de valorile E citite pentru aceasta la fotometrul Pulfrich și de concentrația creatininei, exprimată în mg, și citită pe curba etalon.

Valoarea diagnostică. În urina normală, cantitatea de creatinină variază între 1,2 și 1,5 g/l. Hipercreatininemia se întîlnește în cazurile unui consum excesiv de alimente bogate în proteine, după efortul muscular susținut și în atrofia musculară. În urina normală a pacienților adulți creatinina este absentă.

1.7.4. DETERMINAREA UREEI. METODA AMBARD-HALLION

Principiul reacției. Ureea reacționează cu hipobromitul de sodiu în prezența unui exces de hidroxid de sodiu, cu formare de azot, bioxid de carbon, apă și bromură de sodiu. Bioxidul de carbon format

reacționează cu NaOH trecînd în soluție, iar volumul de azot degajat în reacția (1) este măsurat cu ajutorul aparatului Kowarsky.

$$3NaOBr + C(=O)(NH_2)_2 \longrightarrow N_2 + CO_2 + 3NaBr + 2H_2O. \quad (1)$$

Cantitatea de uree se calculează după volumul de azot degajat, ținîndu-se seamă de temperatura și presiunea la care s-a realizat dozarea.

Reactivi necesari: 1) Soluția Kowarsky. Se dizolvă la cald 150 g de sulfat de potasiu și 350 g de clorură de sodiu în 700—800 ml de apă distilată. După răcire volumul se aduce la 1 l și soluția se filtrează. 2) Hidroxid de sodiu, soluție 33%; 3) Brom, soluție concentrată. 4) Acid tricloracetic, soluție 10%. 5) Soluții pentru deproteinizare după E. Macovschi. *Soluția (A)* constă din 1,2 g de acetat de zinc dizolvate în 20 ml de apă distilată, la care se adaugă 20 ml de acid acetic glacial. *Soluția (B)* se prepară prin dizolvarea a 5 g de fericianură de potasiu în 50 ml de apă distilată. 6) Hipobromit de sodiu. Într-un cilindru gradat se măsoară cu pipeta 20 ml de hidroxid de sodiu, soluție 33%, puternic răcită (—2°C) și 40 de picături de brom concentrat. Soluția se prepară înainte de utilizare și se conservă în întuneric și la temperaturi scăzute (—2°C) în frigider. La fiecare 2—3 zile, soluția se reface.

Descrierea ureometrului Kowarsky. Ureometrul Kowarsky (fig. 31) constă dintr-un tub de sticlă în formă de *U* prevăzut cu două robinete R_1 și R_2, o pîlnie gradată *A* și un braț gradat în partea superioară în diviziuni de 0,02 cm, iar în porțiunea inferioară, din 0,1 în 0,1 cm *B*. Robinetul R_2 (cu trei căi) permite atît unirea celor două brațe ale ureometrului *B* și *C*, cît și comunicarea separată sau concomitentă a acestora cu tubul de evacuare *D*. Pîlnia gradată *A* servește la măsurarea soluțiilor introduse în aparat în timpul determinărilor. Brațul lateral *C* servește la efectuarea manipulărilor necesare în timpul dozării.

Modul de lucru

Prepararea probelor pentru analiză. Serul sanguin proaspăt separat este deproteinizat după procedeul Macovschi. La 5 ml de ser se adaugă 5 ml de *soluție A* (v. reacția), se agită energic și apoi se adaugă cu o pipetă 10 ml de *soluție B*. Conținutul eprubetei se agită și se filtrează (centrifughează), obținîndu-se un lichid galben transparent (serul defecat).

Pregătirea ureometrului Kowarsky. Cu ajutorul celor două robinete R_1 și R_2 se pun în legătură cele două brațe ale ureometrului *B* și *C* cu pîlnia gradată. Se introduce apoi prin brațul negradat *C* soluție Kowarsky pînă cînd aceasta apare în pîlnia gradată a ureometrului. Formarea bulelor de aer în ureometru în timpul umplerii trebuie evitată, deoarece influențează negativ asupra rezultatelor. Se închide robinetul R_1 și prin sifonare se îndepărtează soluția Kowarsky din pîlnia *C* și pîlnia se spală de 2—3 ori cu apă distilată.

Robinetul R_2 se stabilește în poziția care permite comunicarea dintre brațul B al ureometrului cu tubul de evacuare D, ceea ce permite evacuarea soluției Kowarsky din brațul B cînd robinetul A este deschis.

Serul sanguin, deproteinizat și limpede, se introduce în pîlnia A a aparatului și se notează diviziunea indicată de nivelul serului. În funcție de cantitatea de uree în serul de analizat se introduce în brațul gradat B al aparatului volumul necesar de ser deproteinizat: 1,25; 2,5 sau 5 ml. Robinetul R_1 se închide și restul de ser din pîlnia A se îndepărtează prin sifonare și pîlnia se spală de 2—3 ori cu apă distilată și, în final, cu un volum mic de hipobromit de sodiu.

În pîlnia A se adaugă cu pipeta 6 ml de NaBrO și deschizîndu-se din nou robinetul R_1 se introduc în brațul B al ureometrului exact 5 ml de hipobromit, după care, cu ajutorul robinetului R_2, cele două brațe B și C se pun în legătură unul cu celălalt.

În partea superioară a brațului gradat B se observă o degajare abundentă de gaz, care se acumulează în imediata apropiere a pîlniei A.

După 10—15 minute, brațul C al ureometrului Kowarsky este pus în legătură cu tubul de evacuare D cu ajutorul robinetului R_2. Soluția Kowarsky din brațul C este evacuată pînă în momentul cînd nivelul lichidelor din brațul B și C devine egal, cînd cele două brațe comunică prin intermediul robinetului R_2.

Proba martor se realizează în același mod, fără a se utiliza serul sanguin. Se notează temperatura și presiunea la care s-a efectuat determinarea. Utilizîndu-se volumul de N_2 citit la aparat și tabelul Kowarsky (tabela 11) se calculează cantitatea de uree prezentă în sînge.

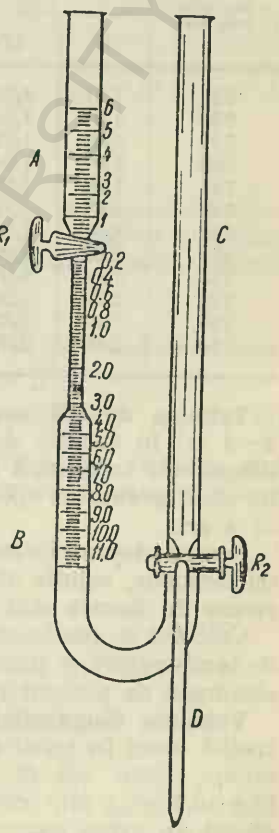


Fig. 31. Ureometrul Kowarsky.

Exemplu. Pentru proba de analizat (cu ser) volumul de azot degajat a fost egal cu 0,16 ml, iar pentru proba martor, 0,02 ml N_2. Dozarea s-a efectuat la temperatura de 20°C și presiunea atmosferică de 755 mm Hg. Volumul de azot corespunzător probei cu ser și corectat, ținîndu-se seama de proba martor, este de 0,14 ml. În tabelul Kowarsky, la intersecția celor două drepte ridicate la temperatura și

presiunea atmosferică indicate găsim factorul 1,95. Cantitatea de uree la litru de ser sanguin va fi egală cu:

$$0{,}14 \times 1{,}95 = 0{,}2730 \text{ g‰}.$$

Tabela 11

Determinarea ureei după metoda Kowarsky (pentru eşantioane iniţiale de ser de 1,25 ml; 1 ml de azot corespunde la 1 g de uree la 1 în condiţiile de temperatură şi presiune menţionate)

Presiunea (mm Hg)	Temperatura °C								
	10°	12°	14°	16°	18°	20°	22°	24°	25°
710	1,91	1,90	1,88	1,86	1,84	1,83	1,81	1,80	1,78
720	1,94	1,92	1,91	1,89	1,87	1,85	1,84	1,82	1,80
725	1,95	1,93	1,92	1,90	1,89	1,87	1,85	1,83	1,82
730	1,97	1,94	1,93	1,91	1,90	1,88	1,86	1,85	1,83
735	1,98	1,96	1,94	1,93	1,91	1,89	1,88	1,86	1,84
740	1,99	1,97	1,96	1,94	1,92	1,90	1,89	1,87	1,86
745	2,01	1,99	1,98	1,96	1,94	1,92	1,91	1,88	1,87
750	2,02	2,00	1,99	1,97	1,95	1,93	1,92	1,90	1,88
755	2,04	2,02	2,00	1,98	1,96	1,95	1,93	1,92	1,90
760	2,05	2,03	2,01	2,00	1,98	1,98	1,95	1,93	1,91
765	2,07	2,05	2,03	2,01	1,99	1,97	1,96	1,94	1,92
770	2,08	2,07	2,04	2,02	2,00	1,98	1,97	1,95	1,93

Tehnica dozării ureei în urină. Urina este în prealabil diluată de 2—4 ori în funcţie de greutatea ei specifică. Dacă greutatea specifică a urinei este inferioară sau egală cu 1,010, eşantionul se diluează de 2 ori, iar cînd greutatea specifică este superioară cifrei de 1,010 diluţia se face de 4 ori.

Pentru deproteinizare se amestecă volume egale de urină şi de acid tricloracetic, soluţie 10%, se agită energic şi se filtrează. Operaţiile ulterioare de dozare sînt aceleaşi ca în cazul serului sanguin.

Calculul se realizează în funcţie de diluţie, de volumul de azot rezultat, de temperatură şi presiunea atmosferică, precum şi de cantitatea de urină eliminată de pacient în 24 de ore.

Valoarea diagnostică. După unii autori, limitele normale ale concentraţiei ureei în serul sanguin sînt cuprinse între 0,2 şi 0,4 g‰, după alţi autori, între 0,3 şi 0,5 ‰. Valorile care depăşesc limita superioară (0,4—0,5 g‰) sînt considerate ca indicînd o stare patologică a organismului. În urina pacienţilor normali, eliminată în 24 de ore, cantitatea de uree este de 3 g/l.

1.7.5. DETERMINAREA AMONIACULUI ÎN URINĂ (INDICELE DE FORMOL RONCHÈSE)

Concentraţia amoniacului din urina eliminată în 24 de ore variază între 0,5 şi 1 g‰ şi depinde de starea fiziologică a organismului. Astfel, în cazurile de diabet, concentraţia amoniacului în urină creşte pînă la

2—2,5 g‰, iar în starea de precomă diabetică, cifrele ajung chiar pînă la 12 g‰.

Reactivi necesari: 1) Fenolftaleină, soluție saturată (8% preparată în alcool); 2) Hidroxid de sodiu, soluție *N*/10; 3) Formol titrat și diluat cu apă distilată (1 : 1).

Modul de lucru. Într-un balon Erlenmeyer de 250 ml se pun cu o pipetă 10 ml de urină și 100 ml de apă distilată fiartă și răcită. Soluția se agită energic și se titrează în prezență de fenolftaleină cu hidroxid de sodiu *N*/10 pînă la obținerea unei colorații roz—pal. Se adaugă 20 ml de formol diluat și titrat și după agitare se titrează cu soluție de NaOH *N*/10 pînă la obținerea unei colorații roz pal. Se notează volumul de soluție de NaOH *N*/10 utilizat pentru a doua titrare. Fie *n*, numărul de ml de NaOH *N*/10 utilizați. Indicele de formol va fi:

$$g‰\ NH_3 = 0{,}170 \times n.$$

Acest procedeu permite pe lîngă dozarea amoniacului și titrarea unor cantități neînsemnate de aminoacizi prezenți în urină. Deoarece mai mult de 85—90% din cifrele obținute corespund amoniacului, această metodă prezintă un interes clinic incontestabil.

Temă:

— Folosind ecuația (1) să se stabilească coeficientul de echivalență pentru soluția NaOH *N*/10 utilizată pentru dozarea amoniacului:

$$6CH_2O + 4NH_4Cl = (CH_2)_6N_4 + 4HCl + 6H_2O. \qquad (1)$$

— Să se explice de ce formula $g‰\ NH_3 = 0{,}173 \times n$ este corectă, deși pentru analiză s-au utilizat 10 ml de urină, iar rezultatul este exprimat în g‰.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

CAPITOLUL

ENZIME

„Este greu, cred eu, să supraestimăm importanța pentru biologie, — și îndrăznesc s-o spun, nu într-o măsură mai mică pentru chimie, — a studiilor ample despre fermenți și acțiunea lor."

Hopkins, F. G.

2.1. NOȚIUNI GENERALE

Enzimele sau fermenții sînt substanțe organice termolabile, elaborate de animale, plante, microorganisme și virusuri, capabile să catalizeze reacțiile chimice din organismele vii.

Toate enzimele separate și studiate sînt de natură proteică. Ele sînt răspîndite în toate celulele vii, și cel puțin, în lumea animală și vegetală, sînt repartizate foarte inegal. Astfel, tripsina, pepsina, lipaza și alte enzime se găsesc într-un număr limitat de organe și țesuturi, în timp ce alte enzime, de exemplu, succindehidrogenaza, citocromoxidaza etc., se găsesc în fiecare celulă. Repartizarea teritorială a enzimelor în interiorul celulei este încă insuficient de bine cunoscută. Numărul enzimelor prezente într-o celulă rămîne, de asemenea, necunoscut. *Studiile recente efectuate pe diferite organite celulare au demonstrat că formațiile ultramicroscopice posedă un echipament enzimatic propriu și, în același timp, adecvat funcțiilor fiziologice pe care le îndeplinesc în celulă.*

Natura proteică a enzimelor condiționează în mare parte proprietățile acestora. Enzimele au o greutate moleculară mare și formează soluții coloidale, ceea ce preîntîmpină difuzia lor dintr-o celulă în altă celulă, condiționînd astfel localizarea reacțiilor biochimice în organismele vii. *În prezent pentru fiecare substanță organică separată din produsele naturale de origină animală sau vegetală, precum și pentru un număr impresionant de substanțe anorganice, se cunosc enzimele care pot cataliza degradarea și sinteza lor.* Numărul enzimelor separate și studiate crește din an în an și pe măsură ce metodele de investigație se perfecționează este de așteptat separarea de noi enzime.

Enzimele sînt substanțe relativ instabile, care în condiții necorespunzătoare (soluții concentrate de acizi și alcalii, temperatură ridicată, reactivi cu o puternică acțiune destructivă asupra substanțelor organice etc.), se denaturează pierzîndu-și, parțial sau total, activitatea. Majoritatea enzimelor de obicei devin inactive în soluții cu un *p*H mai mic de 5 și mai

mare de 9, cu toate că unele enzime, de exemplu, fosfataza acidă, fosfataza bazică și altele fac excepție de la această regulă. Ajustarea *p*H-ului unei soluții enzimatice la o valoare dorită trebuie efectuată întotdeauna la temperatura de 0°C, în băi de gheață, fără ca adăugarea reactivului să se facă picătură cu picătură. Evitarea zonelor de distrugere a enzimei, care se pot forma în jurul picăturilor, se realizează dacă reactivii sînt adăugați pe pereții vasului și soluția este energic agitată.

Denaturarea unor enzime are loc și la nivelul suprafețelor de separare, din care cauză, formarea emulsiilor în procesele de recristalizare a preparatelor enzimatice cu ajutorul sulfatului de amoniu sau pe parcursul separării trebuie evitată cu multă grijă.

Metodele de preparare a extractelor enzimatice din materialele biologice comportă, de regulă, centrifugarea extractelor pentru separarea fragmentelor celulare rezultate după mojararea materialului. Centrifuga de răcire a devenit un instrument indispensabil pentru evitarea creșterii temperaturii extractului în timpul centrifugării. Nu întotdeauna însă separarea prin centrifugare este metoda cea mai eficace. În unele cazuri, cînd diferența dintre densitatea fazelor lichide și solide este foarte mică, de exemplu, cînd se folosesc soluții saturate de sulfat de amoniu, ceea ce reduce foarte mult eficiența centrifugării, se recomandă separarea componentelor extractului prin filtrare.

Utilizarea enzimelor în industria fermentativă și alimentară, în medicină și în agricultură necesită, pe de o parte, studiul amănunțit al acțiunii enzimelor asupra diferitelor substrate, iar pe de altă parte, cunoașterea aprofundată a proceselor enzimatice.

2.2. METODE DE PREPARARE A ENZIMELOR

2.2.1. PREPARAREA RIBONUCLEAZEI DIN PANCREAS. METODA KUNITZ

Principiul metodei. Extractul acid obținut din țesutul pancreatic este fracționat cu sulfat de amoniu și ribonucleaza este recristalizată.

Reactivi necesari: 1) Acid sulfuric 0,25 *N*; 2) Sulfat de amoniu, în preparat; 3) Roșu de metil; 4) Hidroxid de sodiu, soluție 4,85 *N*; 5) Acid sulfuric, soluție *N*; 6) Sulfat de amoniu, soluție saturată; 7) Alcool etilic.

Modul de lucru. Pancreasul de bovine, aproximativ 8 kg, recoltat imediat după sacrificarea animalelor, este introdus rapid într-o soluție răcită de acid sulfuric 0,25*N*. Țesutul trebuie să fie acoperit complet de soluție[1].

[1] Prelucrarea materialului se recomandă să se facă imediat după recoltarea lui și numai în cazuri extreme el poate fi conservat pînă a doua zi în frigider, la temperatura de +5°C.

Țesutul pancreatic se scoate din soluție, și țesuturile conjunctiv și adipos aderente sînt îndepărtate. Pancreasul se macerează și se introduce din nou pentru 18—24 de ore în soluție de acid sulfuric 0,25*N*, la temperatura de 5°C. Amestecul se filtrează printr-un filtru de tifon. Filtratul obținut se tratează cu sulfat de amoniu, în preparat, pentru fiecare litru de filtrat adăugîndu-se 390 g de $(NH_4)_2SO_4$. Precipitatul care se formează se filtrează prin filtru cutat. Filtratul, limpede și incolor, se folosește pentru prepararea ribonucleazei, iar reziduul reținut pe filtru poate fi utilizat pentru separarea altor enzime (tripsinogen, tripsină și chimotripsinogen).

În continuare, pentru separarea ribonucleazei, la fiecare litru de filtrat limpede se adaugă cîte 140 g de sulfat de amoniu, în preparat, și amestecul se lasă în repaus timp de două zile pentru depunerea sedimentului. În prima zi, sedimentarea poate fi accelerată prin agitarea periodică a filtratului și prin îndepărtarea regulată a emulsiei care se formează. Partea alicotă este sifonată, iar suspensia rămasă se presează, fiind trecută printr-un filtru dens de hîrtie. Din cele 8 kg de țesut pancreatic recoltate inițial se obțin aproximativ 30 g de preparat umed de ribonuclează.

Cristalizarea ribonucleazei. Preparatul umed de ribonuclează se dizolvă în apă distilată, pentru fiecare 10 g de produs utilizîndu-se 50 ml de apă distilată. Se aduce *p*H-ul soluției la 4,85 cu ajutorul unei soluții de hidroxid de sodiu 4,85*N*, în prezența roșului de metil. Volumul final al soluției se măsoară și apoi se adaugă 50 ml de soluție saturată de sulfat de amoniu. Amestecul se filtrează la vid, folosindu-se o masă densă de hîrtie de filtru. Filtratul rezultat, care trebuie să fie limpede, se aduce la *p*H=4,2 cu ajutorul soluției normale de acid sulfuric și, ulterior, pentru fiecare 100 ml de filtrat se adaugă cîte 66 ml de soluție saturată de sulfat de amoniu. Adăugarea soluției de sulfat de amoniu se face treptat, în volume mici, agitîndu-se concomitent întreaga cantitate a filtratului. Se formează un precipitat, care este imediat separat prin filtrare.

Precipitatul este redizolvat în apă distilată (10 ml de apă distilată pentru fiecare 10 g de precipitat) și filtrat la vid. Reziduul se spală de cîteva ori (3—4 ori) cu cîte 2—3 ml de apă distilată. Filtratul și apele de spălare sînt reunite și volumul lor final se aduce la 20 ml cu apă distilată. La acest amestec se adaugă 7 ml sulfat de amoniu, soluție concentrată, lichidul agitîndu-se permanent cu ajutorul unei baghete de sticlă. Amestecul se lasă în repaus la temperatura de 20—25°C și după 30—90 minute în soluție apar cristale de ribonuclează sub forma unor ace sau plachete alungite care se grupează în snopuri. După cîteva zile, cristalele sînt separate din soluție prin filtrare. Din cele 10 g de preparat umed inițial se obțin 1,5—2,2 g de ribonuclează cristalizată. Randamentul poate fi substanțial îmbunătățit dacă la filtratul rezultat după separarea ribonucleazei se adaugă soluție saturată de sulfat de amoniu pînă la apariția unei slabe opalescențe. După cîteva zile, se observă formarea de cristale (aproximativ 2—4 g). În funcție de gradul de puritate necesar pentru utilizarea ulterioară a preparatului de ribonuclează se procedează la recristalizarea acestuia, fie numai din soluția saturată de sulfat de amoniu,

fie suplimentar, prin recristalizarea din alcool etilic. În ultimul caz, preparatul de ribonuclează este mai pur, însă randamentul metodei scade simţitor.

— **Recristalizarea din sulfat de amoniu.** Se dizolvă 10 g de ribonuclează în 20 ml de apă distilată. Soluţia se filtrează cu ajutorul pîlniei Büchner. Filtratul este spălat cu 2—3 ml de apă distilată, în repetate rînduri. Filtratul şi apele de spălare se reunesc, se aduc la 30 ml cu apă distilată, după care la soluţia enzimei se adaugă 10 ml de sulfat de amoniu, soluţie saturată. Amestecul se lasă în repaus, timp de 48—64 de ore, la temperatura camerei, iar cristalele care s-au format sînt separate prin filtrare. Randamentul metodei este de aproximativ 50%, obţinîndu-se circa 5 g. Tratarea suplimentară a filtratului cu soluţie de sulfat de amoniu poate îmbunătăţi randamentul metodei.

— **Recristalizarea ribonucleazei din alcool etilic** se face numai în cazul cînd preparatul a fost recristalizat iniţial din $(NH_4)_2SO_4$. În acest scop se dizolvă 10 g de cristale de ribonuclează în 15 ml de apă distilată şi soluţia este dializată timp de 24 de ore, folosindu-se apă distilată răcită. Dializatul se aduce la 50 ml cu apă distilată, se răceşte la +5°C şi, agitîndu-se permanent, se adaugă cu pipeta 60 ml de soluţie alcool etilic 60% (temperatura soluţiei alcoolice nu trebuie să depăşească +5°C). Prin conservarea soluţiei la rece, în cîteva ore apare un precipitat dens şi amorf care se transformă ulterior în cristale dreptunghiulare sau aciculare, grupate în rozete fusiforme. După 2—3 zile, cristalele sînt separate prin filtrare pe o pîlnie Büchner şi spălate de cîte ori cu alcool etilic rece (96%). Cristalele sînt uscate în exicator, sub vacuum, pe clorură de calciu, timp de 48 de ore şi apoi sînt uscate pe o hîrtie de filtru la temperatura camerei timp de 24 de ore. Preparatul de ribonuclează, recristalizată din alcool, poate fi conservat timp îndelungat, la rece, fără să se altereze şi să-şi piardă activitatea.

2.2.2. PREPARAREA DEZOXIRIBONUCLEAZEI DIN PANCREAS. METODA BAUMGARTEN ŞI COLABORATORII

Reactivi necesari: 1) Acid sulfuric, soluţii 0,25 *N*, 0,0025 *N* şi 0,1 *N*; 2) Hidroxid de sodiu, 50%; 3) Acid sulfuric, soluţie 20%; 4) Sulfat de amoniu, soluţie saturată; 5) Alcool etilic.

Modul de lucru. Se iau 1,5 kg de pancreas bovin, congelate cu ajutorul zăpezii carbonice, se trec prin maşina de tocat, răcită în frigider, şi maceratul rezultat se colectează într-un recipient care conţine 3,3 l soluţie rece de acid sulfuric 0,25*N*. Amestecul este agitat uşor şi permanent în decurs de 1 oră, cu ajutorul unui agitator magnetic. După aceea se adaugă 473 g de sulfat de amoniu în preparat şi agitarea soluţiei continuă timp de 60 de minute. La soluţia astfel obţinută se adaugă aproximativ 50—60 ml de hidroxid de sodiu 50% pînă la obţinerea unui *p*H cuprins între 1,5 şi 4,5. Soluţia se lasă în repaus 24 de ore la temperatura de 2—5°C. Amestecul se filtrează şi filtratul limpede este adus la *p*H=1,5—2,0 prin adăugarea,

picătură cu picătură, a 50—70 ml soluție de acid sulfuric 20%. Filtratul se agită energic și din nou se lasă în repaus la 2°C, timp de 18 ore. Sedimentul care se formează este îndepărtat prin centrifugare și partea alicotă este tratată cu sulfat de amoniu, în preparat, utilizîndu-se cîte 121 g $(NH_4)_2SO_4$ pentru fiecare litru de soluție.

După 16 ore sedimentul este colectat prin centrifugarea soluției și amestecat cu 90 ml de apă distilată rece. Soluția rezultată se agită timp de 60 de minute cu ajutorul unui agitator magnetic și sedimentul insolubil se îndepărtează prin centrifugarea soluției. La fiecare litru centrifugat se adaugă cîte 205 ml de soluție saturată de sulfat de amoniu și amestecul se lasă în repaus timp de 18 ore, la 2—5°C. Precipitatul care apare se separă prin centrifugare. Supernatantul (centrifugatul) se tratează cu cîte 225 ml de soluție saturată de sulfat de amoniu pentru fiecare litru de soluție și amestecul se lasă din nou în repaus, timp de 16—72 de ore, la temperatura de 2—5°C. Se formează un precipitat care este colectat după centrifugarea amestecului și imediat amestecat cu 30 ml de apă distilată rece. *p*H-ul acestui amestec trebuie să fie inferior valorii de 3,3, în caz contrar se aduce la valoarea corespunzătoare cu ajutorul unei soluții de acid sulfuric 0,1*N*.

Soluția enzimei este dializată timp de 72 de ore, la temperatura de 2°C, utilizîndu-se un volum de soluție de acid sulfuric 0,0025*N*, care depășește de 15 ori volumul soluției dializate. La sfîrșitul dializei, *p*H-ul dializatului trebuie să fie inferior valorii 3,0. Dializatul este trecut printr-un filtru bacterian și uscat prin liofilizare.

Recristalizarea dezoxiribonucleazei. Se iau 2 g de dezoxiribonuclează liofilizată și se dizolvă în 200 ml de apă distilată rece și *p*H-ul soluției se aduce la 4 cu ajutorul hidroxidului de sodiu, soluție 1*N*. După aceea se adaugă 8 ml de soluție saturată de sulfat de amoniu (temperatura soluției maximum +3°C) și după răcirea amestecului la temperatura de 0°C, se pun cu pipeta, încet și prin agitare permanentă, 13 ml de alcool etilic 95%. *Temperatura alcoolului trebuie să nu fie superioară valorii de minus 20°C, iar temperatura soluției enzimei după adăugarea alcoolului să nu depășească +3°C.* Amestecul se lasă în repaus, timp de 16—24 ore, la temperatura +3°C, și precipitatul format se separă prin centrifugare la o centrifugă cu răcire. Partea alicotă obținută după centrifugare este din nou tratată cu 4,3 ml alcool etilic 95% rece (—20°C) și amestecul se lasă în repaus timp de 16—24 ore, la temperatură scăzută (—8°C) pentru completa precipitare a enzimei. Precipitatul rezultat este colectat prin centrifugare, ulterior dizolvat în apă distilată rece și liofilizat.

2.2.3. PREPARAREA POLINUCLEOTIDFOSFORILAZEI DIN ȚESUTUL HEPATIC REGENERAT. METODA BOGOIAVLENSKAIA, TONGUR

Principiul metodei. Sistemul enzimatic care participă la sinteza poliribonucleotidelor din țesutul hepatic regenerat este extras prin salifierea extractelor apoase, și polinucleotidfosforilaza este precipitată cu sulfat de amoniu.

Reactivi necesari: 1) Clorură de sodiu, soluție 0,14 *M*; 2) Clorură de potasiu, soluție 0,15 *M*; 3) Fosfați, soluție tampon 0,01 M, *p*H=7,4; 4) Sulfat de amoniu, soluții 10% și 30%; 5) *ATP*; 6) *ADP*; 7) Glicil-glicină; 8) Versen; 9) Hidroxid de potasiu, soluție 10%; 10) Tris-HCl, *p*H=8.

Modul de lucru. Șobolanii în greutate de 150—170 g sînt ușor anesteziați cu eter și lobii anterior și stîng ai ficatului sînt îndepărtați. Hepatectomia (îndepărtarea parțială a țesutului hepatic) se face în condiții aseptice. După o perioadă de 72 de ore de la hepatectomie, animalele sînt sacrificate. Cu 24 de ore înainte de sacrificare, animalele nu mai sînt hrănite. Țesutul hepatic regenerat (lobii anterior și stîng) este spălat cu soluție fiziologică 0,14 *M*, rece, uscat prin tamponare cu hîrtie de filtru, tăiat în bucăți mici și introdus pentru 15—20 de minute în acetonă amestecată cu zăpadă carbonică. Țesutul este scos din soluția de acetonă, din nou uscat prin tamponare cu hîrtie de filtru și cîntărit. Se iau aproximativ 40 g de țesut hepatic regenerat, care se aduc la temperatura de 0°C, prin simpla expunere la temperatura camerei și se omogenizează în decurs de 2 minute într-un volum, egal cu volumul țesutului luat pentru experiență, de soluție de clorură de potasiu 0,15 *M*.

Omogenatul este centrifugat timp de 1 oră la 10 000 turații/minut și supernatantul este dializat timp de 18 ore, utilizîndu-se o soluție tampon de fosfați 0,1 *M* și cu un *p*H=7,4. Dializatul este fracționat cu ajutorul soluției de sulfat de amoniu de diferite concentrații: 18% (fracția I) și 30% (fracția II). Cantitatea fracției I (12—14 ml), care nu conține dezaminaze ale compușilor adenilici, este neînsemnată în comparație cu fracția a II-a. Sulfatul de amoniu, în preparat, se adaugă la dializat, se agită cu grijă timp de 20 minute și soluția este centrifugată 1 oră la 10 000 turații/minut. Supernatantul este îndepărtat, iar precipitatul se dizolvă în soluție tampon de fosfați 0,01 *M*, *p*H=7,4 care conține și cisteină (10 μg/ml) (s-a calculat volumul soluției tampon folosite pentru dizolvarea precipitatului, astfel încît în soluția finală proteina să constituie 3—5 mg într-un mililitru din fracția I și 12—20 mg într-un mililitru al fracției a II-a).

Soluția rezultată este din nou supusă dializei în decurs de 4 ore, la 1°C, în care scop se folosește o soluție tampon de fosfați, agitîndu-se permanent în timpul dializei. Dacă agitarea permanentă este dificil de realizat, timpul de dializă se prelungește la 18 ore. Dializatul obținut este centrifugat 20 de minute la 10 000 turații/minut și partea alicotă este utilizată ca soluție enzimatică. *Toate operațiile efectuate pentru prepararea polinucleotidfosforilazei se recomandă să se realizeze în camera-frigider, iar soluția enzimatică obținută să fie imediat utilizată, deoarece se degradează sau cu timpul își pierde activitatea chiar și în condițiile unei conservări adecvate, la temperaturi scăzute.*

Activitatea enzimatică a preparatului este controlată astfel: în două eprubete cu dop rodat se introduce cîte 1 ml de soluție $MgCl_2$, care conține 20 μmol, și respectiv 50 μmol de glicilglicină, 12 mg de acid adenozintrifosforic sau 12 mg de acid adenozindifosforic și 87 μg de versen. Amestecul de reacție se aduce la —*p*H=8 cu ajutorul hidroxidului de potasiu, soluție 10%. Se recoltează apoi 0,5 ml din amestecul de reacție la care se adaugă 0,5 ml din fracția enzimatică cercetată și noul amestec este incubat 15—20 de minute la 37°C. Pentru control se folosesc probe care conțin aceleași componente și sînt incubate la 0°C, timp de 15—20 minute, sau probe în care lipsește fermentul sau adenozinfosfații.

Polinucleotidele sintetizate în timpul incubației sînt extrase în decurs de 18 ore, la 0°C cu ajutorul unei soluții de Tris- HCl 0,1 *M*, *p*H=8. (Se va studia compoziția nucleotidică a preparatelor prin metodele descrise în primul capitol al prezentei lucrări.)

2.3. INFLUENȚA AGENȚILOR FIZICO-CHIMICI ASUPRA ACTIVITĂȚII ENZIMELOR

2.3.1. INFLUENȚA TEMPERATURII

Reactivi necesari: 1) Carbonat de calciu, în preparat; 2) Apă oxigenată, soluție *N*/2; 3) Tiosulfat de sodiu, soluție *N*/10; 4) Amidon, soluție 1%; 5) Iodură de potasiu, soluție 10%; 6) Molibdat de amoniu, soluție 1%; 7) Acid sulfuric, soluție diluată (5 ml de H_2SO_4 se aduc la 100 ml cu apă distilată).

Modul de lucru

Prepararea catalazei din cartofi. Se taie cu un cuțit inoxidabil 10 g de cartofi și se mojarează cu 5 g de carbonat de calciu. Amestecul se trece cantitativ într-un cilindru gradat de 50 ml și se aduce la semn cu apă distilată. Conținutul cilindrului gradat se agită energic și se lasă în repaus timp de 1 oră. Soluția se filtrează printr-un filtru de vată.

În patru baloane Erlenmeyer se iau cîte 10 ml din extractul obținut din cartofi, care conține catalază. Una din probe se lasă în repaus la temperatura camerei; proba a doua se introduce într-o baie de apă, la temperatura de 60°C, timp de 10 minute, proba numărul trei se încălzește timp de 10 minute pe o baie de apă la 80°C și proba a patra se încălzește la fierbere, la flacăra unui bec de gaz.

După 30 de minute, în fiecare probă se pun cu pipeta 10 ml de soluție H_2O_2 *N*/2 și conținutul baloanelor se agită cu grijă. La 15 minute după adăugarea apei oxigenate se adaugă cu pipeta în toate probele cîte 10 ml

de soluție diluată de H_2SO_4, 10 ml de KI 10% și 2—3 picături de soluție molibdat de amoniu 1%.

Conținutul baloanelor se agită energic și după 2—3 minute, probele sînt titrate cu soluție de $Na_2S_2O_3$ *N*/10, pînă la apariția unei colorații galbene limon, cînd în probe se pune cu pipeta 0,5—1 ml de soluție amidon 1% și titrarea se continuă pînă la dispariția completă a colorației albastre. Datele experimentale, exprimate în ml de soluție $Na_2S_2O_3$ *N*/10, sînt expuse pe ordonată, iar temperatura la care probele au fost încălzite pe abscisă, obținîndu-se astfel un grafic, care demonstrează influența temperaturii asupra activității catalizei în probele 1—4. Explicați rezultatele obținute.

2.3.2. INFLUENȚA pH-ului ASUPRA ACTIVITĂȚII CATALAZEI VEGETALE

Reactivi necesari: 1) Reactivii descriși la tehnica precedentă; 2) Acid clorhidric, soluție 1 *N*; 3) Hidroxid de sodiu, soluție 1 *N*.

Modul de lucru. În trei baloane Erlenmeyer se măsoară cu pipeta cîte 10 ml de extract vegetal obținut din cartofi. În primul balon se adaugă 2 ml de apă, în al doilea balon, 2 ml de soluție HCl *N*, iar în balonul al treilea, 2 ml de soluție de NaOH *N*. Conținutul baloanelor se agită și în fiecare se adaugă cu pipeta cîte 10 ml de soluție de H_2O_2 *N*/2. Se determină activitatea catalazei ca în cazul descris anterior pentru inactivarea enzimei la temperaturi înalte și rezultatele se compară, considerîndu-se că în balonul 1 *p*H-ul soluției este aproximativ 7, în balonul al doilea *p*H-ul este 2, iar în ultimul balon — 12.

2.3.3. INFLUENȚA IONILOR METALELOR GRELE ASUPRA ACTIVITĂȚII UREAZEI ȘI LIPAZEI

Reactivi necesari: Sulfat de cupru, soluție 2%; 2) Uree, soluție 0,5%; 3) Fenolftaleină, soluție alcoolică 1%; 4) Sulfat de magneziu, soluție 2%; 5) Hidroxid de sodiu, soluție *N*/200.

Modul de lucru

Prepararea ureazei și lipazei. Ureaza se obține din boabele de soia și a fost preparată pentru prima dată, în stare cristalizată (fig. 32), în anul 1932 de către Sumner. Pentru separarea ureazei, se amestecă 100 g de soia, fin mojarate, cu 300 ml de soluție de acetonă 32% și după 2—3 ore de extracție, lichidul se filtrează la rece. Filtratul este centrifugat la 6 000—7 000 turații/minut și ureaza separată sub formă de cristale octaedrice. Prepararea lipazei pancreatice vezi metoda Rona și Michaelis.

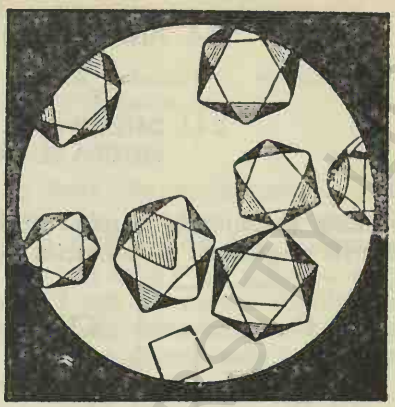


Fig. 32. Cristale de uree (după Sumner).

2.3.3.1. Influența ionilor de cupru asupra activității ureazei

În trei eprubete se pune cu pipeta cîte 1 ml din soluția de uree 2%. Una din eprubete (1) se încălzește la fierbere; în eprubeta (2) se pune cu pipeta 0,3—0,4 ml soluție de $CuSO_4$ 2% și în toate trei eprubetele se adaugă 1 ml soluție de uree 0,5%. Probele sînt introduse într-o baie de apă la 30°C. După 1/2 oră, probele sînt scoase din baia de apă și în fiecare se adaugă 2—4 picături de soluție de fenolftaleină 1%. În eprubeta *1* soluția nu se colorează, deoarece enzima a fost inactivă prin fierberea soluției; în *2* soluția rămîne, de asemenea, incoloră, acțiunea ureazei fiind anihilată de ionii de Cu^{++} prezenți în amestec; în eprubeta *3*, soluția se colorează în roz, datorită prezenței amoniacului format din uree sub acțiunea enzimatică a ureazei.

2.3.3.2. Influența ionilor de magneziu asupra activității lipazei

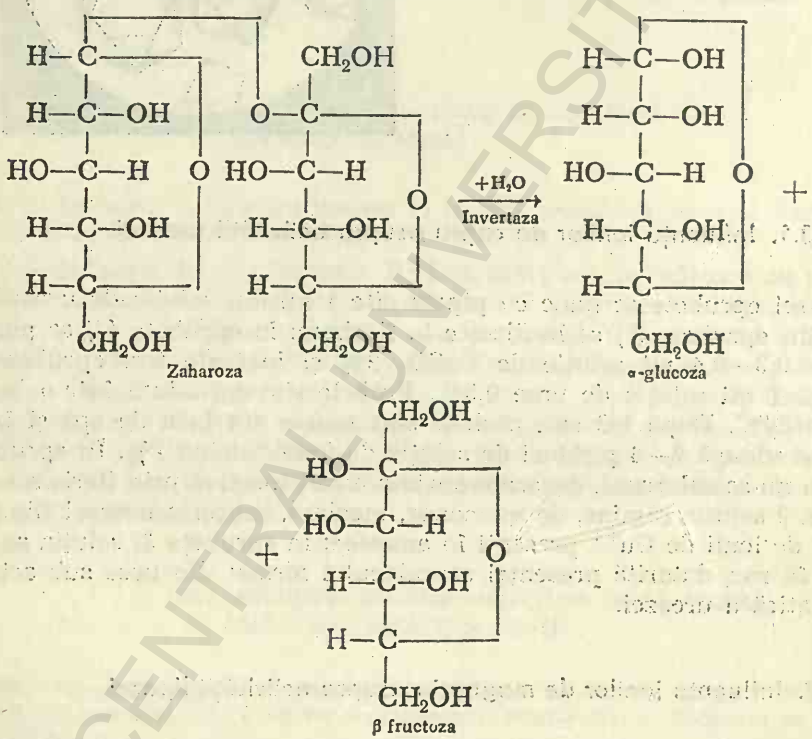
Se măsoară cu o pipetă în trei eprubete cîte 2 ml de soluție de enzimă. Proba (1) se încălzește la fierbere; în proba (2) se adaugă 4 picături soluție de sulfat de magneziu 2%; în eprubeta (3) nu se adaugă nimic. Cele trei probe sînt introduse într-o baie de apă, la 38°C, timp de 1 oră, după care în fiecare probă se adaugă 2—3 picături de fenolftaleină și conținutul eprubetelor se titrează cu soluție de NaOH *N*/200 pînă la obținerea unei colorații roz-pal.

Temă. Să se explice de ce cantitatea de NaOH utilizată pentru neutralizarea celor trei probe este diferită și care este efectul ionilor de magneziu asupra activității lipazei pancreatice.

2.4. ANALIZĂ CANTITATIVĂ

2.4.1. DETERMINAREA ACTIVITĂȚII INVERTAZEI. METODA SUMNER ȘI HOWELL

Invertaza acționează asupra dizaharidului zaharoza, hidrolizîndu-l cu formare de α-glucoză și β-fructoză (1).



(1)

Enzima identificată exclusiv în plante și microorganisme este cunoscută în literatura biochimică sub mai multe denumiri: zaharaza, β-fructozidaza, invertaza. Această enzimă hidrolizează pe lîngă zaharoză și următoarele triozide: rafinoza, genţianoza, stahioza, însă este inactivă față de polioze (inulina, amidonul etc.).

Invertaza descoperită, în anul 1871, în intestinul animalelor și a cărei origină este sucul pancreatic, se numește maltază și problema identității ei cu invertaza vegetală este încă nelămurită.

Principiul metodei. **Metoda se bazează pe determinarea cantitativă a zaharurilor reducătoare rezultate după acțiunea preparatului enzi-**

matic asupra unei soluții de zaharoză. Zaharurile reducătoare sînt dozate cantitativ după metoda Bertrand.

Reactivi necesari: 1) Reactivi pentru dozarea zaharurilor reducătoare, după Bertrand; 2) Zaharoză, soluție 5%; 3) Hidroxid de sodiu, soluție 2%.

Modul de lucru

Prepararea zaharazei din drojdia de bere. Se mojarează în prezența nisipului de cuarț 20 g de drojdie de bere și se trec într-un balon Erlenmeyer cu ajutorul a 20 ml de soluție de $(NH_4)_2HPO_4$ 10%, adăugîndu-se ulterior 2 ml de toluen. Balonul Erlenmeyer se introduce în termostat la 37—38°C și se lasă în repaus 2 ore. În aceste condiții are loc autoliza celulelor drojdiei de bere și enzima zaharaza trece în soluție. După 2 ore, soluția este centrifugată și partea alicotă este folosită pentru dozarea activității zaharazei.

În zece baloane Erlenmeyer, al căror volum este de 100 ml, se măsoară cu o pipetă cîte 5 ml soluție de zaharoză 5% și 1 ml de soluție de enzimă. Proba martor constă dintr-un mililitru de enzimă și 5 ml de soluție de NaOH 2% și se încălzește la fierbere. Probele și martorul se introduc în termostat la 37°C.

După 15, 30, 45, 60 și 90 de minute, în două probe paralele se adaugă cu o pipetă 5 ml de soluție NaOH 2% și conținutul lor se încălzește la fierbere pe o baie de apă. Martorul se determină împreună cu probele în care s-a adăugat hidroxid de sodiu după 15 minute de la adăugarea enzimei.

Zaharurile reducătoare se dozează după metoda Bertrand, (descrisă amănunțit în capitolul Glucide).

Activitatea invertazei obținută din drojdia de bere se exprimă în unități de activitate. *O unitate de activitate enzimatică este egală cu cantitatea de zaharuri reducătoare, exprimată în mg, rezultată după 5 minute de acțiune a enzimei asupra substratului.*

Temă. Să se construiască curba activității enzimatice a preparatului de invertază în funcție de timpul de hidroliză și să se interpreteze rezultatele obținute.

Observații. Activitatea invertazei poate fi dozată și cu ajutorul polarimetrului, doarece în cazul de față, în soluția de analizat este prezentă o singură substanță optic activă care se dozează, zaharoza $[\alpha]=+66,5°$. În acest caz, se notează timpul necesar pentru obținerea unei inversii a 4 g de zaharoză.

2.4.2. DETERMINAREA ACTIVITĂȚII CATALAZEI. METODA BACH ȘI ZUBKOVA

Loew, în anul 1901, demonstrează prezența unei enzime (catalaza) larg răspîndit în lumea animală și vegetală, care descompune apa oxigenată cu formare de hidrogen și oxigen molecular. Sumner și Dounce,

în 1937, reușesc să izoleze această enzimă din ficatul bovinelor, sub formă de cristale (fig. 33).

Catalaza face parte din grupa enzimelor în a căror structură intră patru nuclee pirolice și un atom de fier. Mecanismul de acțiune a enzimei este însă insuficient de clar. Se presupune că procesul are loc în două etape: în prima etapă, catalaza se „combină" cu apa oxigenată; complexul format reacționează cu încă o moleculă de H_2O_2, eliberînd doi atomi de hidrogen și oxigen molecular. În a doua etapă, catalaza redusă este din nou oxidată și procesul se repetă (1, 2):

$$4Fe^{+++} + 2H_2O = 4Fe^{++} + 4H^+ + {}^1/_2O_2 \quad (1)$$

$$4Fe^{++} + 4H^+ + O_2 = 4Fe^{+++} + 2H_2O. \quad (2)$$

Despre mecanismul de acțiune al catalazei, Haber și Willstätter (1931), Oppenheimer și Stern (1939), Keilin și Hartree (1939) au emis numeroase ipoteze și scheme. Cu toate acestea, problema procesului intim, al interacțiunii dintre enzimă și substrat, rămîne încă neclarificată.

Catalaza este o enzimă cu o înaltă specificitate (descompune exclusiv apa oxigenată și nu acționează asupra altor substrate) și este foarte activă: o moleculă de catalază descompune timp de 1 minut și la o temperatură de 0°C 2 600 000 molecule de H_2O_2. Temperatura optimă la care enzima manifestă maximum de activitate este cuprinsă între 0 și 10°C.

Activitatea catalazei poate fi determinată în eșantioane de sînge sau în extractele vegetale pe cale titrimetrică, dozîndu-se cantitatea de apă oxigenată rămasă nedescompusă, sau pe cale manometrică, măsurîndu-se volumul de oxigen degajat în timpul reacției. Descriem mai jos metoda de dozare a activității catalazei din sînge după A. N. Bach și S. Zubkova.

Principiul metodei. Excesul de apă oxigenată este dozat în mediu acid cu permanganat de potasiu. Reacția decurge după ecuația (3):

$$5H_2O_2 + 2KMnO_4 + 3H_2SO_4 = 8H_2O + K_2SO_4 + 2MnSO_4 + 5O_2. \quad (3)$$

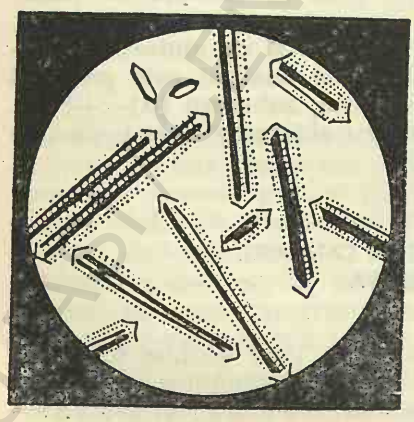


Fig. 33. Cristale de catalază, preparate din țesutul hepatic al bovinelor (după Sumner și Dounce).

Reactivi necesari: 1) Apă oxigenată, soluție 1%, proaspăt preparată din perhidrol concentrat; 2) Acid sulfuric, soluție 10%; 3) Permanganat de potasiu, soluție 0,1*N*.

Modul de lucru. Se iau 0,2 ml de sînge proaspăt recoltat și se diluează de 1 : 1 000 cu apă distilată. În două eprubete curate se măsoară cu pipeta cîte 1 ml de sînge diluat, 7 ml de apă distilată și 2 ml de soluție apă oxigenată 1%. Una din probe este încălzită pe o baie de apă fierbinte pînă la coagularea sîngelui. Ambele probe sînt apoi introduse pentru 30 de minute într-o baie de apă termostatată la 17°C. În prima eprubetă, care conține sînge necoagulat, se observă degajarea energică a numeroase bule de oxigen, ca urmare a descompunerii apei oxigenate de către catalază, în timp ce în a doua eprubetă, în care enzima a fost inactivată sub acțiunea căldurii, nu se poate constata degajarea O_2. După 30 de minute, în ambele probe se adaugă cu o pipetă 3 ml de soluție acid sulfuric 10%, pentru blocarea reacției de descompunere a apei oxigenate declanșate de catalază, și probele sînt titrate cu soluția de $KMnO_4$ 0,1*N*.

Exemplu de calcul. Pentru titrarea probei cu catalază activă s-au consumat, de exemplu, —5,4 ml de soluție permanganat de potasiu 0,1 *N*, iar pentru proba martor —14,2; diferența de 8,8 ml de $KMnO_4$ 0,1 *N* a fost utilizată pentru titrarea excesului de apă oxigenată. Calcularea rezultatelor se efectuează ținîndu-se seama de faptul că 1 ml de soluție $KMnO_4$ 0,1 *N* este echivalent cu 1 ml de soluție H_2O_2 0,1 *N*. Deoarece 1 ml de soluție H_2O_2 0,1 *N* corespunde la 1,7 mg de H_2O_2, activitatea catalazei, exprimată în mg de apă oxigenată, descompusă în 30 de minute pentru exemplul de mai sus, va fi egală cu:

$$8{,}8 \times 1{,}7 = 14{,}96 \text{ mg } H_2O_2.$$

Se definește ca indice catalazic cantitatea de apă oxigenată, exprimată în miligrame, descompusă de 0,1 ml de sînge în decurs de 30 de minute.

În sîngele uman, indicele catalazic variază între 12 și 20. La mamifere catalaza este localizată exclusiv în eritrocite, fiind absentă în plasma și serul sanguin.

2.4.3. ROLUL CATALAZEI ÎN SÎNGE (DEMONSTRAȚIE)

Reactivi necesari: 1) Oxalat de amoniu, preparat chimic pur; 2) Cianură de sodiu, soluție *N*/100; 3) Apă oxigenată, soluție 2,5%.

Modul de lucru. În două eprubete se cîntărește între 0,1 și 0,2 g de oxalat de sodiu și, de la un animal de experiență, de exemplu, de la iepure, se recoltează între 2 și 3 ml de sînge. În eprubeta (1) se introduc cîteva picături de soluție cianură de sodiu *N*/100, și ulterior, în ambele eprubete se pun cu pipeta 1—2 ml de soluție apă oxigenată 2,5%.

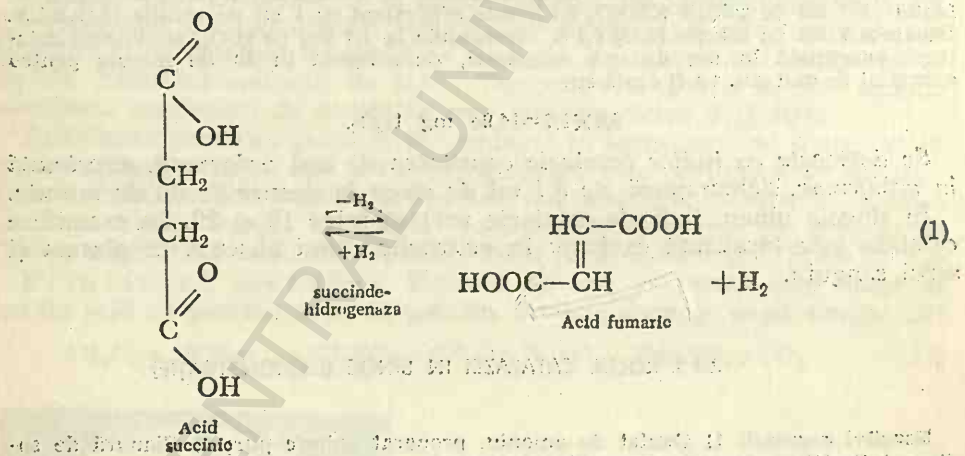
În eprubeta (*1*), sîngele într-o primă etapă devine mai închis la culoare, apoi capătă o nuanță cenușie — verde și în cele din urmă se decolorează. Sub influența cianurii de sodiu, catalaza sanguină a fost inactivată și apa oxigenată din amestec acționînd asupra globulelor roșii provoacă liza acestora și degradarea hemoglobinei. În eprubetă (*2*), sîngele își păstrează culoarea obișnuită.

2.4.4. DETERMINAREA ACTIVITĂȚII SUCCINDEHIDROGENAZEI. METODA THUNBERG

Succindehidrogenaza a fost descoperită de T h u n b e r g, în 1909. Mai tîrziu, s-a demonstrat că succindehidrogenaza împreună cu citocromul c și citocromoxidaza formează un sistem enzimatic corelativ.

Succindehidrogenaza, participînd activ la procesele respirației celulare, este o enzimă larg răspîndită în diferite organe animale: inimă, ficat, rinichi, creier, mușchi striați, plămîni, glandă suprarenală, splină etc. În organismul animal, succindehidrogenaza nu se întîlnește în sînge, pancreas și tiroidă. La unele plante se găsește în cantități relativ mici în semințe.

Succindehidrogenaza oxidează acidul succinic cu formare de acid fumaric, în prezența obligatorie a unui acceptor de hidrogen, care, in vitro, poate fi înlocuit cu diferiți coloranți: albastru de metilen, indofenol-blau, toluen-blau etc. În țesuturi, hidrogenul este transportat de sistemul enzimatic succindehidrogenază — citocrom — citocromoxidază și, în final, combinîndu-se cu oxigenul, formează apă.



Reactivi necesari: 1) Acid succinic soluție 1%; 2) Albastru de metilen, soluție 1%; 3) Soluție tampon de fosfați *p*H=6,8 (v. anexa).

Modul de lucru. Țesutul muscular este mojarat atent și spălat de mai multe ori cu cîte 5 ml de apă pentru îndepărtarea substanțelor reducătoare, care pot reacționa ulterior cu acceptorul de hidrogen. Pentru experiențe se recomandă folosirea trituratului muscular, deoarece activitatea succindehidrazei în extractul muscular scade foarte repede.

În trei tuburi T h u n b e r g (fig. 34, *a*) se introduc cîte 1 ml de soluție tampon de fosfați (*p*H=6,8) și 2 ml de soluție albastru de metilen 0,1%. În tubul *1* și 2 se pun cu o pipetă 1 ml de soluție de acid succinic 1%, iar în tubul *2* și *3* cîte 1 ml și, respectiv, 0.5 ml de apă distilată. Conținutul

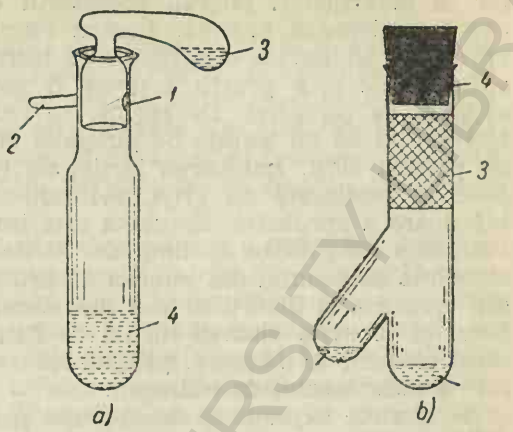


Fig. 34. — Tuburi Thunberg.
a — Tubul Thunberg de construcție originală:
1 — dop de sticlă șlefuit, prevăzut cu orificiu pentru conectarea cu tubul lateral *2*; *3* — diverticul pentru reactivi; *4* — omogenatul țisular a cărui activitate enzimatică se măsoară; *b* — Tubul Thunberg modificat de E. Macovschi: *1* — diverticul pentru reactivi; *2* — omogenatul țisular; *3* — hîrtie de filtru îmbibată cu soluție de pirogalol; *4* — dop de cauciuc.

tuburilor Thunberg se agită energic și în tuburile *1* și *3* se adaugă 0,5 g de triturat de mușchi. Toate tuburile se închid cu dopul rodat și, cu ajutorul pompei de vid, aerul este evacuat și apoi prin răsucirea șlifului în direcția opusă tubului lateral, probele sînt închise ermetic și deconectate de la trompa de vid. Probele se introduc apoi într-o baie de apă, pentru 5—10 minute, la o temperatură de 37—40°C.

După acest interval de timp, în tuburile Thunberg se observă următoarele:

— în tubul *1*, unde este prezentă enzima (succindehidrogenaza), acidul succinic și albastrul de metilen, soluția s-a decolorat, ceea ce dovedește oxidarea acidului succinic cu formare de acid fumaric (reacția 1). Soluția este incoloră deoarece albastrul de metilen a fost redus cu formarea leucoderivatului corespunzător;

— în tubul *2*, unde sînt prezente numai două componente ale amestecului — acidul succinic și albastrul de metilen —, nu are loc reducerea ultimului, deoarece lipsește enzima. Soluția rămîne colorată în albastru;

— în tubul *3*, în care s-au adăugat enzima și soluția de albastru de metilen, amestecul este colorat, deoarece acidul succinic — sursa atomilor de hidrogen — nu este prezent în soluție și, în consecință, albastrul de metilen nu poate fi redus.

Metoda Thunberg a fost modificată de numeroși cercetători, care au încercat folosirea unor acceptori de hidrogen care să permită, pe de o parte, să se lucreze în prezența oxigenului, iar pe de altă parte, să precizeze mai exact momentul decolorării acceptorului de hidrogen. Dintre toate variantele modificate ale metodei Thunberg, cea mai interesantă și practică este modificarea descrisă de E. Macovschi.

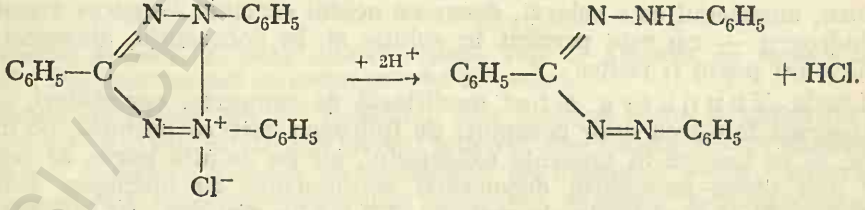
În locul tuburilor originale Thunberg s-a propus folosirea eprubetelor obișnuite, cu o capacitate de 10—20 ml, prevăzute cu un diverticul lateral (fig. 34, *b*). În partea inferioară a eprubetei se introduc soluția tampon și extractul în care urmează să se dozeze activitatea dehidrazei,

iar în diverticulul lateral, acceptorul de hidrogen şi substratul asupra căruia acţionează enzima. Pentru eliminarea oxigenului din interiorul eprubetei, în partea superioară se introduce un sul de hîrtie de filtru suficient de gros pentru a putea fi montat şi se umectează cu soluţie alcalină de pirogalol. De regulă, se recomandă utilizarea unui amestec format din 30 ml soluţie de pirogalol 30% şi 175 ml soluţie de hidroxid de potasiu 60%. Îmbibarea hîrtiei de filtru cu soluţie alcalină de pirogalol se realizează cu grijă, evitîndu-se pătrunderea soluţiei în partea inferioară a eprubetei. Eprubeta este imediat închisă ermetic cu ajutorul unui dop de cauciuc şi timp de 30 de minute lăsată în repaus pentru absorbţia oxigenului din interiorul eprubetei. După 30 de minute, soluţiile din eprubetă şi diverticul sînt amestecate prin înclinarea uşoară a eprubetei (a se evita eluarea hîrtiei de filtru îmbibată cu pirogalol!) şi din acest moment se măsoară, cu ajutorul unui cronometru, timpul de decolorare a acceptorului de hidrogen.

Rezultatele experimentale obţinute prin metoda Thunberg în modificarea Macovschi sînt similare cu cele obţinute cu ajutorul tuburilor Thunberg originale. Tehnica modificată, descrisă de E. Macovschi şi colaboratori, prezintă avantajul că poate fi practicată în condiţii de teren şi laboratoare amplasate departe de reţeaua de canalizare dotată cu conducte de apă sub presiune.

2.4.5. DETERMINAREA ACTIVITĂŢII DEHIDRAZELOR ÎN ŢESUTURILE VII. METODA PÎLNEV

Principiul metodei. Reactivul 2, 3, 5-trifeniltetrazol, incolor, este redus de hidrogenul rezultat după acţiunea dehidrazelor asupra substratului, trecînd în formazan, compus colorat în roşu, care are două maxime de absorbţie în regiunile roşu şi violet ale spectrului. Formazanul, insolubil în apă, este extras cu acetonă sau alcool izopropilic şi densitatea optică a extractelor este măsurată la fotoelectrocolorimetru.



2, 3, 5 trifeniltetrazol — Formazan

Reactivi necesari: 1) 2, 3, 5, trifeniltetrazol[1], soluţie 0,25%, preparată în soluţie tampon de fosfaţi 1/15 *M*, *p*H=7,17 (soluţia tampon Sörensen); 2) Soluţie tampon de fosfaţi 1/15 *M*, *p*H=7,17; 3) Acetonă; 4) Alcool izopropilic.

[1] Soluţia de 2, 3, 5 trifeniltetrazol se conservă în flacoane de sticlă brună.

Modul de lucru

Prepararea materialului. Activitatea dehidrazelor poate fi determinată pe material vegetal diferit: seminţe, fructe şi frunze. În cazul fructelor şi seminţelor se prepară secţiuni microscopice a căror grosime nu trebuie să depăşească 1,5—2 mm. Secţiunile microscopice sînt cîntărite la balanţa analitică şi spălate cu apă distilată. Din discul foliar al frunzelor, recoltate de la diferite etaje se iau probe fără nervuri, pe cît posibil, din zonele simetrice ale frunzei.

Prepararea extractelor. Pentru fiecare determinare a activităţii dehidrazelor se recoltează minimum trei probe paralele a cîte 50—100 mg fiecare. Probele se introduc în fiole de cîntărire. Două probe sînt tratate cu soluţie de 2, 3, 5-trifeniltetrazol şi proba a treia (martor), cu soluţie tampon de fosfaţi. Materialul analizat (secţiuni microscopice, discuri foliare etc.) este afundat în soluţii, în perioada de infiltrare, cu ajutorul unei baghete de sticlă. Fiolele de cîntărire sînt introduse într-un exicator în care se face un vid moderat cu ajutorul unei pompe cu ulei, pînă în momentul cînd degajarea bulelor de aer din soluţie se întrerupe. Apoi în exicatorul de vacuum se introduce treptat aer, în decurs de 1—2 minute. Sub influenţa presiunii, care creşte pe măsură ce pătrunde aerul în exicator, soluţia de 2, 3, 5-trifeniltetrazol, în care sînt probele de ţesut supuse analizei, pătrunde în celule şi în ţesut (fie prin părţile lezate, în cazul secţiunilor macroscopice, fie prin stomate, în cazul frunzelor). Cînd presiunea din exicator este egală cu presiunea atmosferică, probele sînt scoase din exicator şi fiolele de cîntărire sînt acoperite cu şlifurile corespunzătoare şi introduse pentru 30 minute într-un termostat, la 37°C.

Secţiunile macroscopice şi ţesuturile vegetale se colorează în roşu, intensitatea coloraţiei fiind în funcţie de activitatea dehidrazelor. După 30 de minute, fiecare probă este atent şi rapid mojarată (într-un mojar de dimensiuni reduse), în prezenţa a 5—10 ml de acetonă sau de alcool propilic. Volumul final al extractului fiecărei probe se aduce la 10—15 ml într-un cilindru gradat, cu ajutorul solventului utilizat anterior. Extracţia ţesutului este considerată adecvată în funcţie de decolorarea materialului analizat în procesul tratării acestuia cu solvent organic.

Prepararea probelor pentru citirea la fotoelectrocolorimetru. Probele, imediat după mojarare, sînt centrifugate timp de 5—10 minute la 1 500—2 000 turaţii/minut şi centrifugatul colorat folosit pentru citirea la fotoelectrocolorimetru, FEK-N-57. Dacă proba de control este incoloră, citirea probelor se efectuează folosindu-se filtrul albastru (λ=453 mμ). Cînd proba de control este colorată în verde (datorită extragerii colorofilei prezente în material, de exemplu, în frunze) se utilizează filtrul verde (λ= =508—536 mμ).

Activitatea dehidrazelor se calculează cu ajutorul unui „indice de activitate", care reprezintă diferenţa dintre densitatea optică a probelor de cercetat şi densitatea optică a probei martor, exprimată în numere întregi.

De exemplu, media densității optice a două probe paralele este de 0,285, iar a probei de control (martor), de 0,123. „Indicele de activitate" a dehidrazelor din materialul analizat va fi egal cu 162.

Observații. Micrometoda vacuum-infiltrării are avantaje incontestabile față de metoda clasică de determinare a activității dehidrazelor după tehnica Thunberg. Metoda cu albastru de metilen necesită recoltarea de probe care solicitau o cantitate relativ mare de material și determinarea se efectua în țesuturile distruse, deci în material acelular. În extractele colorate, folosite pentru dozarea activității dehidrazelor, de exemplu, din frunze, decolorarea albastrului de metilen este greu de apreciat, din care cauză, determinarea avea un caracter subiectiv. Micrometoda descrisă mai sus permite determinarea activității dehidrazelor în materialul vegetal intact din punct de vedere anatomo-morfologic și este mult mai precisă.

2.4.6. DETERMINAREA ACTIVITĂȚII PEROXIDAZEI VEGETALE. METODA CU PIROGALOL

Peroxidaza — enzimă larg răspîndită în regnul vegetal — în prezența apei oxigenate, catalizează oxidarea fenolilor și a aminelor aromatice. Pirocatechina sub acțiunea peroxidazei trece în o-chinonă, pirogalolul se transformă cu formare de purpurogalină, iar oxidarea o-crezolului este însoțită de dezvoltarea unei colorații verzi intense.

Rolul peroxidazei celulare se rezumă, în principal, la activarea peroxizilor, în particular a apei oxigenate, care, de regulă, au o acțiune oxidativă slabă asupra compușilor fenolici prezenți în țesuturile vegetale. În celule, peroxidaza se găsește sub două forme: *forma solubilă*, liberă, care poate fi ușor obținută prin extragerea materialului vegetal cu apă sau cu soluții tampon și *forma insolubilă*, strîns legată de elementele structurale ale celulei, a cărei extragere necesită o prelucrare prealabilă corespunzătoare a materialului.

Principiul metodei. Pirogalolul în soluții apoase, în prezența apei oxigenate și a peroxidazei, trece în purpurogalină. Cantitatea de purpurogalină formată este direct proporțională cu activitatea peroxidazei.

Reactivi necesari: 1) Pirogalol, soluție 5%, preparată în apă distilată; 2) Apă oxigenată, soluție 0,5%; 3) Acid sulfuric, soluție 10%; 4) Eter etilic; 5) Toluen; 6) Soluție tampon de fosfați, pH=8—9; 7) KJO_3, soluție 8%.

Modul de lucru

Prepararea extractelor enzimatice. Materialul vegetal în care urmează să se determine activitatea peroxidazei libere este mojarat în prezența nisipului de cuarț, din care urmele de fier au fost atent îndepărtate. Peroxidaza este extrasă cu apă distilată sau cu soluții tampon de fosfați ușor alcalinizate cu apă de barită pînă la pH=8—9. Extracția durează de la 4 la 6 ore și pentru evitarea contaminării și dezvoltării florei micro-

biene în timpul extracției se recomandă adăugarea de cloroform sau toluen (cîteva picături) la soluție. Volumul de soluție tampon folosit pentru extragerea peroxidazei din materialul analizat variază în funcție de cantitatea acestuia și de activitatea peroxidazei.

Forma greu solubilă a peroxidazei vegetale, care este legată de elementele structurale ale celulei, este extrasă cu acetonă din materialul vegetal, după o prelucrare prealabilă a acestuia. Materialul mojarat este tratat de repetate ori cu volume mici de acetonă (4—6 ml) și după fiecare operație, extractul este îndepărtat. Extracția se repetă pînă la obținerea unei paste incolore și anhidre în care se determină ulterior activitatea peroxidazei.

Determinarea activității peroxidazei. Într-un balon Erlenmeyer de 300 ml se pun cu pipeta 200 ml de apă distilată, 1 ml de soluție de apă oxigenată 0,5% și 10 ml soluție de pirogalol, 5% proaspăt preparată. Amestecul se lasă în repaus timp de 15—20 de minute, la temperatura de 20°C. În funcție de activitatea extractului obținut din eșantioanele de material vegetal, se adaugă la amestecul de mai sus între 1 și 5 ml de extract. Soluția inițială, care conținea apă oxigenată și pirogalol, ușor colorată în galben, își schimbă culoarea aproape instantaneu după adăugarea extractului care conține peroxidază, colorîndu-se intens după 5 minute de acțiune a peroxidazei. Coloratia intensă a soluției se datorește formării unei noi substanțe — purpurogalina. După 5 minute (!) acțiunea peroxidazei este întreruptă prin adăugarea la amestec a 5 ml de acid sulfuric, soluție 10%.

Extragerea purpurogalinei din amestecul de reacție se realizează cu ajutorul eterului etilic. În acest scop, se adaugă 25 ml de eter etilic, se agită prudent, evitîndu-se formarea de emulsie și se trece într-o pîlnie de separare. După separarea în două faze — faza superioară eterică colorată în roșu-cărămiziu și faza inferioară apoasă colorată, de asemenea, în roșu — se colectează într-un balon cotat faza eterică. Faza apoasă este din nou extrasă cu eter etilic — 10 ml. Operația se repetă cu volume din ce în ce mai mici de eter etilic pînă în momentul în care extractul eteric este incolor. Pe parcursul extracției purpurogalinei cu eter etilic se observă colorarea fazei apoase în roșu intens. Acest fapt se datorește formării unui produs secundar al reacției care nu este extras cu eter etilic.

Extractele eterice, care conțin purpurogalină, se reunesc, în final, într-un balon cotat de 50 ml, și volumul lor se aduce la semn cu eter etilic pur. Probele sînt citite la fotoelectrocolorimetrul FEK-N-57 la lungimea de undă de 508 mμ, utilizîndu-se cuva de 5 cm.

Se recomandă citirea rapidă a probelor la FEK pentru a se evita evaporarea eterului etilic și erorile experimentale care survin în urma depunerii purpurogalinei pe partea superioară a pereților cuvei. Dacă valoarea extincției citite corespunde pe curba etalon la mai puțin de 2 mg de purpurogalină, este necesară refacerea probei, utilizîndu-se extracte mai concentrate de peroxidază, sau mărindu-se volumul de extract utilizat.

Obținerea curbei etalon. Pentru construirea curbei etalon se folosește o soluție-stoc de purpurogalină (5 mg/100 ml), preparată cu eter etilic.

Pentru prepararea soluției-stoc este absolut necesar să se utilizeze purpurogalina cristalizată. Prin diluarea cu eter etilic a soluției-stoc de purpurogalină se obțin probe în care concentrația purpurogalinei variază între 10 și 100 g/ml. După citirea probelor etalon la fotoelectrocolorimetru și înscrierea rezultatelor într-un sistem de coordonate, ținîndu-se seama de concentrația purpurogalinei și valorile extincției se obține curba etalon (fig. 35). *Activitatea peroxidazei se exprimă în miligrame de purpurogalină rezultată după acțiunea enzimei asupra pirogalolului, în prezența apei oxigenate, timp de 5 minute și la temperatura de 20°C. Această valoare se numește în literatura biochimică „indice de purpurogalină".*

Observații. pH-ul optim al peroxidazei este variabil în funcție de natura materialului din care a fost extrasă enzima, precum și de substratul asupra căruia se acționează. În majoritatea cazurilor, determinarea activității peroxidazei se realizează în soluții neutre sau slab alcaline și la temperatura de 20°C.

În cazul metodei prezentate mai sus, asupra activității peroxidazei influențează atît cantitatea de pirogalol utilizată, cît și cantitatea și concentrația apei oxigenate. Soluțiile de pirogalol mai concentrate (de exemplu, 10%) influențează sensibil activitatea peroxidazei, micșorîndu-o, în timp ce o concentrație mai mare de 0,5% a H_2O_2 în mediul de reacție inhibă activitatea peroxidazei.

Este absolut necesar să se respecte ordinea în care sînt adăugați reactivii și extractul vegetal.

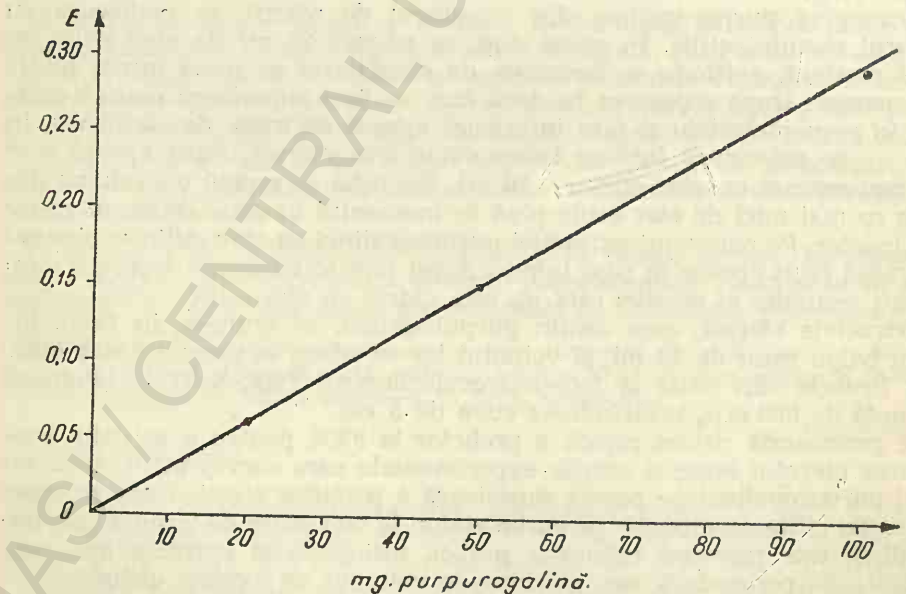


Fig. 35. Curba etalon pentru dozarea activității peroxidazei prin metoda cu pirogalol.

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY

Este contraindicată adăugarea extractului, înainte de a introduce în mediu de reacție substratul — pirogalolul — și apa oxigenată.

Prepararea purpurogalinei. Se dizolvă 10 g de pirogalol în aproximativ 20 ml de apă distilată rece, la care se adaugă dintr-o biuretă 100 ml de soluție KIO_3 8% și se agită continuu (cu ajutorul unui agitator magnetic). Cristalele de purpurogalină, care se formează după adăugarea iodatului, sînt separate prin filtrarea soluției la vid și spălarea cu apă distilată. Ulterior, purpurogalina se dizolvă într-o soluție de alcool etilic 96%, la cald, se filtrează și la filtratul obținut se adaugă 6 volume de apă distilată. Purpurogalina care precipită după adăugarea apei distilate este separată prin filtrare, dizolvată din nou în alcool etilic la cald și reprecipitată prin tratarea soluției cu 6 volume de H_2O distilată. Preparatul de purpurogalină, obținut după filtrarea soluției, este uscat într-un exicator sub vacuum.

2.4.7. DETERMINAREA ACTIVITĂȚII β-AMILAZEI VEGETALE. METODA NOELTING ȘI BERNFELD

Principiul metodei. β-amilaza acționează asupra amidonului cu formare de maltoză liberă, care este dozată colorimetric.

Reactivi necesari: 1) Clorură de sodiu, soluție 6%; 2) Acid tioglicolic, soluție 0,3% și 3%; 3) Amidon solubil, soluție 1%, preparată în soluție tampon de acid acetic-acetat de sodiu, *p*H=5,3·200 mg de amidon solubil se triturează în prezența a 5 ml de soluție tampon, la care se adaugă 5 ml soluție NaOH 2 *N*, eventual încălzindu-se ușor. Se diluează la 200 ml cu ajutorul soluției tampon de acid acetic-acetat de sodiu; 4) acid 3,5-dinitrosalicilic: 1 g de acid 3,5-dinitrosalicilic este amestecat cu cîteva picături de apă distilată, după care la soluție se adaugă lent și agitîndu-se continuu 20 ml de NaOH, soluție 2 *N* și volumul soluției se aduce la 50 ml cu apă bidistilată. După dizolvarea completă a reactivului, la temperatura camerei, se adaugă 30 g de sare Seignette și soluția se aduce la 100 ml cu apă bidistilată. Soluția se filtrează și extincția ei este măsurată la fotoelectrocolorimetru, cu filtrul verde S-53, folosindu-se cuva de 20 mm grosime. Extincția soluției nu trebuie să fie mai mare de 0,11—0,12. Soluția acidului 3,5-dinitrosalicilic se recomandă să fie conservată în flacoane de culoare brună în condiții optime pentru evitarea bioxidului de carbon, a cărui prezență poate diminua alcalinitatea soluției, influențînd asupra rezultatelor; 5) Soluție etalon de maltoză (200 mg maltoză se dizolvă în 100 ml de apă distilată).

Modul de lucru

Extragerea enzimei brute. Embrionii semințelor de grîu sau de porumb sînt omogenizați într-un omogenizator de sticlă, în prezența a 2 ml soluție de NaCl 6%. Omogenatul se aduce la un volum total de 10 ml cu ajutorul soluției de clorură de sodiu 6%. Se adaugă 1 ml de acid tioglicolic 3%, neutralizat în prealabil pînă la o valoare de *p*H=5,5 cu carbonat de sodiu și omogenatul este extras timp de 12 ore la 20°C. Extractul este centrifugat la 15 000 turații/minut, într-o centrifugă cu răcire. Reziduul este

tratat din nou cu 10 ml de NaCl soluție 6% și cele două extracte parțiale sînt reunite.

În cazul folosirii semințelor intacte, acestea sînt mojarate corespunzător și făina rezultată, o cantitate bine determinată, este tratată cu soluție de clorură de sodiu 6% și 1 ml acid tioglicolic 3% cu scopul extragerii amilazei.

Centrifugarea soluțiilor nu poate fi înlocuită cu filtrarea, deoarece în filtratele obținute, activitatea enzimei este foarte diminuată.

În extractele reunite, care conțin enzima brută, sînt prezente două tipuri de amilaze — α-amilaza și β-amilaza — care acționează asupra aceluiași substrat — amidonul. De aceea, este absolut necesar ca α-amilaza prezentă în extract să fie inactivată înainte de a se doza activitatea β-amilazei. În acest scop, *p*H-ul extractului este adus la o valoare inferioară *p*H-ul inițial (care era 5,3), și anume, de la aproximativ 5,1 la 3,6, ceea ce se realizează cu ajutorul unei soluții de acid acetic 8 *N*. În timpul adăugării soluției de acid acetic, amestecul se agită prudent. Ulterior, este necesar ca extractul acidulat să fie agitat cu ajutorul unui agitator mecanic, timp de 15 minute și apoi centrifugat. Întreaga cantitate de α-amilază este distrusă, denaturată și îndepărtată sub forma unui precipitat alb care sedimentează prin centrifugarea extractului.

Activarea formei latente a enzimei se datorește reducerii grupării —S—S— la —SH, grupare specifică pentru enzimă. Această reducere se realizează pe parcursul extracției, datorită folosirii acidului tioglicolic și se desfășoară în condiții optime la un *p*H apropiat de 5,4.

Determinarea activității enzimei. În eprubete perfect curate și uscate se realizează eșantioane a cîte 1 ml de extract enzimatic. Eprubetele se introduc într-un termostat Höpler, reglat la temperatura de 20°C. Se pune cu pipeta în fiecare probă, cronometrîndu-se exact timpul (!), cîte 1 ml de soluție de amidon 1%. Paralel se fac și două probe martor în care extractul enzimatic este înlocuit cu apă distilată. Probele martor sînt tratate în mod similar cu probele de analizat. După 3 minute (!) de la adăugarea soluției de amidon, în fiecare probă se adaugă cu pipeta 2 ml (!) de acid 3,5-dinitrosalicilic, soluție 1%, care oprește acțiunea enzimei asupra amidonului. Probele sînt introduse, pentru 5 minute (!), într-o baie de apă în clocot, apoi răcite. După răcirea probelor într-un curent de apă de robinet, volumul lor se aduce la 20 ml cu apă distilată. Probele sînt citite la fotoelectrocolorimetru, folosindu-se cuva de 20 mm grosime și filtrul care corespunde la lungimea de undă 583 mμ.

Obținerea curbei etalon se realizează folosindu-se probe etalon în care concentrația maltozei variază între 0,2 și 1,2 mg de maltoză (tabela 12).

Calculul rezultatelor. Folosindu-se valorile *E* citite pentru probele cu extract enzimatic și curba etalon (fig. 36) se calculează cantitatea de maltoză care a rezultat după acțiunea β-amilazei asupra amidonului. *Activitatea β-amilazei se exprimă în mg de maltoză care s-au format timp de 3 minute, la 20°C, prin acțiunea β-amilazei asupra unei soluții de amidon 1% preparat în soluție tampon și la un pH de 5,3.*

Tabela 12

Construirea curbei etalon pentru dozarea maltozei rezultată după degradarea amidonului de către β-amilază

Reactivi	Eprubeta						
	1	2	3	4	5	6	7
Soluție standard de maltoză (ml)	0,1	0 2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,0
Acid 3,5-dinitrosalicilic (ml)	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
Apă distilată (ml)	2,9	2,8	2,7	2,6	2,5	2,4	3,0
Probele sînt introduse într-o baie de apă în clocot pentru 5 minute (l exact), după care se răcesc într-un curent de apă de robinet.							
Apă distilată (ml)	15	15	15	15	15	15	15
Volumul final al probelor (ml)	20	20	20	20	20	20	20
Cantitatea de maltoză, exprimată în mg, din fiecare probă	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0	1,2	0,0
E probelor, citită la FEK-N-57, λ=583 m μ	0,07	0,156	0,25	0,342	0,424	0,51	Proba martor

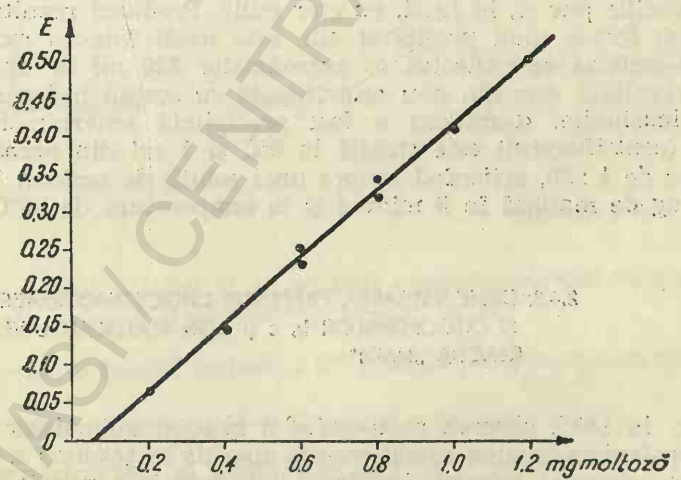


Fig. 36. Curba etalon pentru dozarea maltozei rezultată după acțiunea β-amilazei asupra amidonului.

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Observaţii. Folosirea pe parcursul prelucrării materialului, dacă este necesară această operaţie, a alcoolului metilic, alcoolului etilic, acetonei şi toluenului nu influenţează asupra rezultatelor determinării activităţii β-amilazei. Prezenţa sulfatului de amoniu şi a fosfaţilor în mediul de reacţie este contraindicată, deoarece scade valoarea alcalinităţii soluţiei de acid 3,5-dinitrosalicilic, modificînd astfel condiţiile experimentale. Utilizarea timolului şi cloroformului este inadmisibilă.

Metoda Noelting-Bernfeld este uşor accesibilă, se pretează la dozări în serie şi are o precizie de ±2%. În general, se recomandă ca gradul de degradare a amidonului în timpul incubaţiei probelor la 20°C să nu depăşească 10% şi să fie chiar inferior acestei cifre. În experienţe preliminare, de tatonare a condiţiilor experimentale pentru analiza materialului ales, se poate merge pînă la o degradare a amidonului de 25%.

Prepararea β-amilazei pure. 50 g de făină de grîu sînt agitate timp de 4 ore în prezenţa a 3 l apă distilată şi la 20°C. După 4 ore amestecul este centrifugat la 5 000 turaţii/minut şi extractul se decantează şi se concentrează prin evaporare pînă la obţinerea unui volum final de 300 ml. Dezactivarea α-amilazei se realizează adăugîndu-se la extract, încet şi în volume mici, 75 ml de acid acetic, soluţie *N*, răcită în prealabil la 0°C. Se agită uşor în timpul adăugării soluţiei de acid acetic. Amestecul se lasă în repaus total timp de 6 zile la +3°C.

După 6 zile se adaugă 20 g de acetat de sodiu cristalizat şi *p*H-ul soluţiei se aduce la 4,8, după care soluţia este centrifugată şi precipitatul format îndepărtat.

β-amilaza din centrifugatul obţinut este precipitată prin adăugarea a 900 ml de alcool metilic, la 0°C, agitîndu-se permanent soluţia. Amestecul este centrifugat, precipitatul spălat cu alcool metilic, soluţie 70%, apoi cu alcool metilic pur şi, în final, cu eter etilic. Produsul rezultat, care se prezintă sub forma unui precipitat alb, este uscat într-un exicator sub vacuum. β-amilaza se redizolvă în aproximativ 320 ml de apă distilată şi soluţia rezultată este din nou centrifugată cu scopul îndepărtării substanţelor, insolubile. α-amilaza a fost precipitată anterior. Soluţia de β-amilază (centrifugatul) este stabilă la 0°C şi 1 ml din această soluţie în proporţie de 1 : 20, acţionînd asupra unei soluţii de amidon 1%, eliberează 1,1 mg de maltoză în 3 minute şi la temperatura de 20°C.

2.4.8. DEMONSTRAREA PREZENŢEI CITOCROMOXIDAZEI ŞI CITOCROMILOR b, c şi a ÎN MATERIALUL VEGETAL. REACŢIA „NADI"

Erlich, în 1885, observă că α-naftolul injectat animalelor împreună cu dimetil-p-fenilendiamina condiţionează apariţia în ţesuturi a unei colorăţii albastre, datorită formării indofenolului. Reacţia a primit denumirea de „NADI" de la primele două litere din „naftol" şi „diamina". Mai tîrziu, s-a demonstrat că reacţia este caracteristică atît pentru ţesuturile animale,

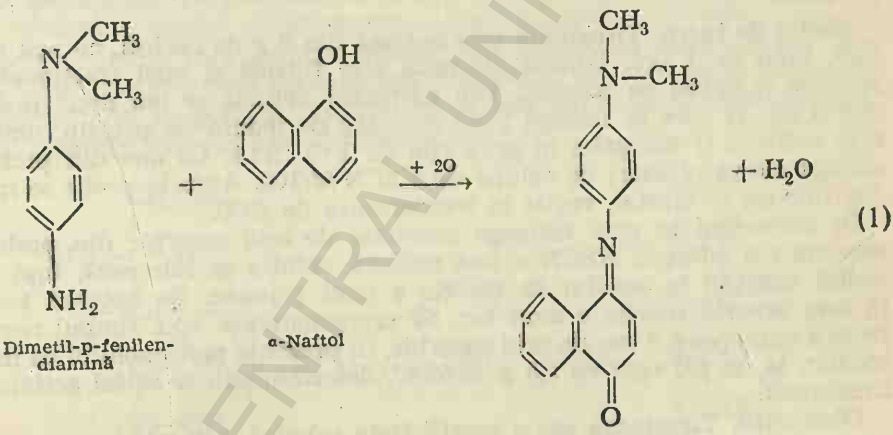
cît și pentru cele vegetale. Keilin observă, în 1933, că enzima care participă la această reacție — indofenoloxidaza — este foarte apropiată ca proprietăți de „fermentul respirator *Warburg*" și propune termenul de citocromoxidază. Acest ferment oxidează substanțele indirect, prin intermediul citocromului *c*, iar acesta, la rîndul lui, oxidează fenolii și aminele prezente în țesuturi.

Reactivi necesari: 1) α-naftol, soluție 1% în alcool; 2) p-fenilendiamină, soluție 1%; 3) Cianură de potasiu, soluție *M*/100.

Modul de lucru. Pe o sticlă de ceas se pun cîteva secțiuni subțiri de cartof, tăiate inoxidabil. Se pun cu pipeta pe secțiuni cîteva picături din soluția de α-naftol și p-fenilendiamină. Porțiunea respectivă din secțiunea de cartof se colorează în albastru, ceea ce dovedește prezența citocromilor și citocromoxidazei.

Se repetă experiența pe o altă secțiune de cartof, în prealabil tratată cu cîteva picături dintr-o soluție de cianură de potasiu *M*/100. Colorația albastră nu mai apare, datorită faptului că enzimele prezente în țesuturi (citocromii *b*, *c* și *a*) au fost inactivate de cianură de potasiu.

Reacția dintre dimetil-p-fenilendiamină și α-naftol poate fi schematic prezentată astfel (1):



Dimetil-p-fenilendiamină — α-Naftol — Indofenol blau (1)

Mecanismul reacției și al acțiunii citocromoxidazei este însă mai complicat și are două etape intermediare (2 și 3).

$$\text{Citocrom } c \text{ (formă redusă)} + H^+ + 1/4\ O_2 \rightarrow \underset{\text{(oxidat)}}{\text{Citocrom } c} + 1/2\ H_2O \qquad (2)$$

$$\text{Citocrom } c \text{ (oxidat)} + H \rightarrow \text{Citocrom } c \text{ (redus)} + H^+. \qquad (3)$$

Citocromoxidaza și citocromii *b*, *c* și *a* participă efectiv la procesele respirației celulare, mecanismul lor de acțiune fiind mult discutat în pre-

zent. Activitatea lor este inhibată de acidul cianhidric sau de sărurile acestuia, de sulfura de carbon, oxidul de carbon (în absența luminii). Fermenții pot fi inactivați și prin încălzire la 60°C.

2.4.9. DETERMINAREA ACTIVITĂȚII TIROZINAZEI. METODA MILLER ȘI DAWSON

Tirozinaza aparține grupului de enzime care conțin cupru și participă în procesele respirației celulare fiind cunoscute sub denumirea generică de hemocianine. Este o enzimă larg răspîndită în regnul vegetal, întîlnindu-se în cantități suficiente, pentru obținerea de preparate, în cartofi, tuberculii de dalie, ciuperca comestibilă *Psalliota campestris*, în mucegaiuri etc. La animale, tirozinaza a fost identificată la lamelibranchiate și moluște. Conținutul cuprului în preparatele de tirozinază variază între 0,2 și 0,4%.

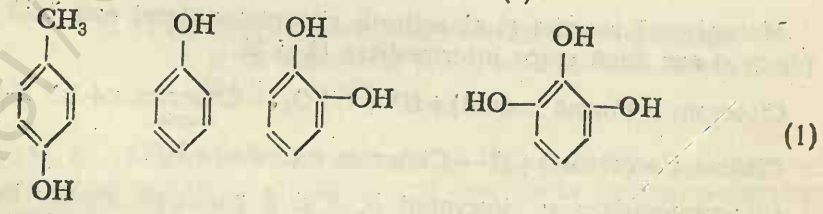
Tirozinaza acționează asupra tirozinei transformînd-o în halocrom, asupra fenolului cu formare de pirocatehină, și apoi în o-chinonă.

Reactivi necesari: 1) Acetonă; 2) Sulfat de amoniu, soluție saturată; 3) Acid ascorbic, 20 mg; 4) Polifenol, soluție; 5) Iodura de potasiu; 6) Amidon; 7) Acid sulfuric; 8) Pirogalol; 9) Soluție tampon *p*H=5,5; 10) Sulfocianura de potasiu, soluție *M*/100.

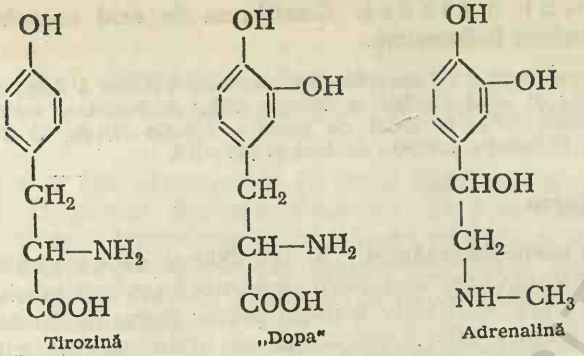
Modul de lucru. Tirozinaza este extrasă din 2 g de cartofi, cu apă distilată, timp de 1 oră. Soluția obținută este filtrată și apoi fracționată cu acetonă și sulfat de amoniu. Din extractul obținut se iau două probe a cîte 5 ml, la care se adaugă 2 ml amestec de iodură de potasiu, amidon, acid sulfuric și pirogalol în proporție de 1 : 1 : 2 : 1. La una din probe se adaugă cîteva picături de soluție de KSCN *M*/100. Ambele probe se introduc într-un termostat, reglat la temperatura de 25°C.

În momentul în care întreaga cantitate de acid ascorbic din proba în care nu s-a adăugat KSCN a fost oxidată, soluția se colorează, fapt care indică apariția în mediul de reacție a unei chinone. Se notează timpul în care această reacție a avut loc. Se cronometrează apoi timpul necesar pentru oxidarea a 8 mg de acid ascorbic, în prezența polifenolului ca intermediar, la un *p*H egal cu 5,5 și la 25°C, determinîndu-se astfel activitatea tirozinazei.

Observații. Tirozinaza are o specificitate relativă, acționînd asupra unui număr mare de compuși: p-crezol, fenol, pirogalol, dioxifenilalanină („Dopa"), tirozină, pirocatechină, adrenalină etc. (1):



p-crezol fenol pirocatechină pirogalol (1)

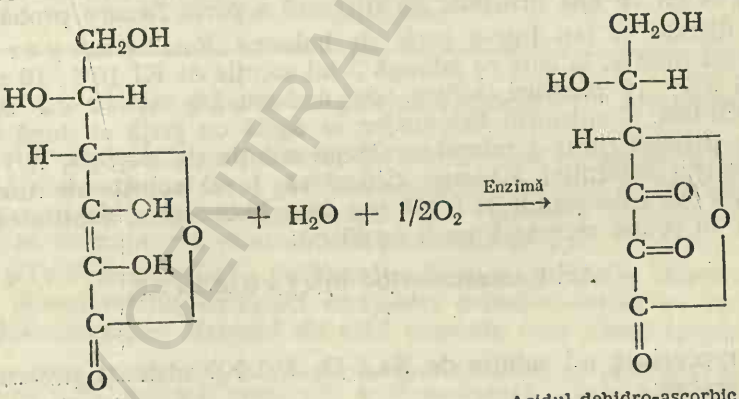


Tirozină „Dopa" Adrenalină

2.4.10. DETERMINAREA ACTIVITĂȚII ASCORBINOXIDAZEI

Acidul ascorbic este oxidat indirect de numeroase enzime, de exemplu, de hexozidaza lui Szent-györgyi, extrasă din *Brassica oleracea*, sau de peroxidază, care acționează în prezența apei oxigenate asupra fenolilor, produsul reacției — chinonele — oxidînd acidul ascorbic.

Ascorbinoxidaza este singura enzimă care acționează direct asupra acidului l-ascorbic și a fost obținută din *Cucurbita pepo* de către Tauber și colaboratorii. În prezența oxigenului și sub influența ascorbinoxidazei, acidul ascorbic trece în acid dehidroascorbic (1):



Acidul l-ascorbic Acidul dehidro-ascorbic

Ascorbinoxidaza, enzimă frecvent întîlnită în regnul vegetal, poate fi preparată în cantități apreciabile din cartofi, banane, castraveți, fasole, salată, din lemnul de *Moringa pterygosperma*, din dovlecei etc. Enzima este o proteidă care conține cupru (între 0,15 și 0,25% Cu) și a fost obținută în stare cristalină.

BCU CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Principiul metodei. Cantitatea de acid ascorbic neoxidată de enzimă se dozează iodometric.

Reactivi necesari: 1) Acid ascorbic, soluție care conține 1 mg/1 ml; 2) Acid sulfuric, soluție 10%; 3) Acid clorhidric, soluție 10%; 4) Amidon, soluție 1%; 5) Iodură de potasiu, soluție 10%; 6) Iodat de potasiu, soluție *N*/100; 7) Tiosulfat de sodiu, soluție *N*/1 000; 8) Soluție tampon de fosfați *p*H=5,9.

Modul de lucru

Prepararea ascorbinoxidazei. Se iau 300 g de *Curcubita pepo* sau de *Solanum tuberosum* care sînt atent mojarate în prezența nisipului de cuarț. Maceratul se trece cantitativ într-un pahar Berzelius și se adaugă 1 l de alcool etilic, soluție 30%. Amestecul se agită energic, cu o baghetă de sticlă, timp de 5 minute și se filtrează. Filtratul obținut este tratat cu un volum egal de acetonă și lichidul este îndepărtat prin centrifugare, reținîndu-se precipitatul. Precipitatul este din nou tratat cu acetonă pentru extragerea ingredienților colorați. Reziduul se dizolvă în 400 ml de apă și enzima se precipită cu ajutorul unui volum egal de acetonă. Preparatul ascorbinoxidazei se păstrează în exicator sub vacuum. Înainte de folosire se prepară o soluție 2% tampon de fosfați, *p*H=5,9.

Determinarea activității ascorbinoxidazei. În trei baloane (cu un volum de 25 ml) se măsoară cu o pipetă cîte 10 ml soluție de ascorbinoxidază. Unul dintre baloane (proba martor) este încălzit pînă la fierberea soluției. În toate baloanele se adaugă cu o pipetă 10 ml soluție de acid ascorbic și probele se introduc în termostat la 37°C, timp de 30 de minute. După aceea, toate probele sînt încălzite la fierbere și conținutul baloanelor este adus la semn cu apă distilată. Se filtrează separat fiecare probă.

Din filtrate se iau într-o serie de baloane Erlenmeyer probe a cîte 10 ml fiecare, la care se adaugă 5 ml soluție de KI 10%, 10 ml soluție de HCl 5%, 10 picături soluție de amidon 1% și 10 ml soluție de KIO_3 *N*/1 000. Conținutul baloanelor se agită cu grijă și după 5—6 minute se titrează dintr-o microbiuretă cu soluție de $Na_2S_2O_3$ *N*/1 000 pînă la dispariția coloratiei albastre. Știind că 1 ml soluție de tiosulfat de sodiu *N*/1 000 corespunde la 0,088 mg de acid ascorbic, cantitatea de acid ascorbic în proba cercetată va fi egală cu:

$$\text{Acid ascorbic} = (b - a) \times f \times 0{,}088 \times 2{,}5,$$

unde:

a — reprezintă ml soluție de $Na_2S_2O_3$ *N*/1 000 utilizați pentru titrarea probei;
b — ml de $Na_2S_2O_3$ *N*/1 000 utilizați pentru titrarea martorului;
f — factorul soluției de tiosulfat de sodiu;
2,5 — factor de diluție (din volumul final al soluției de analizat s-au luat pentru titrare probe de 10 ml (2,5×10=25).

Activitatea ascorbinoxidazei se exprimă în mg de acid ascorbic oxidate în decurs de 30 de minute la 37°C.

2.4.11. DETERMINAREA ACTIVITĂȚII POLIFENOLOXIDAZEI ÎN MATERIALUL VEGETAL. METODA MARGNA

Polifenoloxidaza a fost descoperită în anul 1895 de Bourquelot și Bertrand în planta *Russula nigricans*. În literatura biochimică ea este descrisă și sub denumirea de monofenoloxidază și de tirozinază. Polifenoloxidaza este larg răspîndită în regnul vegetală și animală și este separată relativ ușor din cartofi, bulbii de dalie, din unele ciuperci inferioare și din miceliile acestora.

Polifenoloxidaza este activă numai în prezența oxigenului liber, avînd un maximum de activitate la *p*H=6—8. Substanțele asupra cărora acționează polifenoloxidaza și produșii care rezultă sînt expuse în tabela 13.

Tabela 13

Substratele asupra cărora acționează polifenoloxidaza

Substrat	Produsul reacției enzimatice
Fenol	Pirocatechină
Pirocatechină	O-chinonă
m-Crezol	Homocatechină
p-Crezol	Homocatechină
Homocatechină	Homochinonă
Tirozină	Halocrom

În țesuturile plantelor superioare, polifenoloxidaza este prezentată sub două forme:

— fracția acvosolubilă, care se extrage relativ ușor și formează o parte neînsemnată din suma totală a polifenoloxidazei prezente în țesut și

— fracția adsorbită pe cloroplaste și alte elemente structurale din celulă, care se extrage mai greu și este insolubilă în apă.

Principiul metodei. Polifenoloxidaza în prezența substratului specific — pirocatechina, oxidează enzimatic acidul ascorbic cu formare de acid dehidroascorbic. Excesul de acid ascorbic este dozat iodometric.

Reactivi necesari: 1) Acetonă; 2) Soluție tampon fosfat-citrat, *p*H=7—8; 3) Acid ascorbic, soluție 0,2%, proaspăt preparată; 4) Pirocatechină, soluție 0,5%, proaspăt preparată; 5) Acid sulfuric, soluție 10%; 6) Amidon, soluție 1%, preparată în NaCl; 7) Iodat de potasiu, soluție *N*/100; 8) Iodură de potasiu, cristale; 9) Oxid de aluminiu, în preparat.

Modul de lucru

— **Prepararea extractelor acetonice de polifenoloxidază.** Materialul vegetal proaspăt recoltat este mojarat în prezența acetonei pînă la obținerea unei pudre fine, omogene. Acetona se adaugă treptat în cantități

mici și după mojararea materialului, extractul este filtrat. În eventualitatea că materialul vegetal din care se extrage polifenoloxidaza trece parțial pe filtru împreună cu extractul acetonic, el se readuce în mojar și tratarea materialului vegetal cu acetonă se repetă pînă la extragerea completă a clorofilei. Această operație de tratare a materialului cu acetona se repetă de 5—6 ori, în final obținîndu-se o pudră anhidră, de culoare albă, care reprezintă de fapt preparatele acetonice ale enzimei.

Determinarea polifenoloxidazei în preparatele acetonice este greu de realizat, pe de o parte, datorită prezenței în preparat a țesuturilor vegetale incomplet mojarate, iar pe de altă parte, datorită dificultății de a recolta probe omogene. Din această cauză este necesară o prelucrare suplimentară a extractului acetonic în scopul omogenizării și „diluării" lui. Preparatul acetonic de polifenoloxidază se cîntărește și ulterior se adaugă o cantitate determinată (în funcție de activitatea enzimatică a preparatului) de Al_2O_3, care se stabilește experimental înainte de dozare. Se notează cantitatea de oxid de aluminiu adăugată la preparatul de polifenoloxidază.

— **Determinarea activității polifenoloxidazei.** În două baloane Berzelius se recoltează cîte o probă de preparat acetonic (aproximativ 60—70 mg), la care se adaugă cu o pipetă 10 ml soluție tampon fosfat-citrat (pH = =7—9), 2 ml soluție de acid ascorbic 0,2% și 1 ml soluție de pirocatechină 0,5%. Conținutul balonului se agită timp de 2 minute. Pentru inactivarea enzimei, după 2 minute la amestec se pun cu pipeta 2 ml de acid sulfuric, soluție 10%. În mediul de reacție se adaugă cîteva cristale de iodură de potasiu, 5—6 picături de soluție de amidon 1% și amestecul se titrează cu iodat de potasiu, soluție $N/100$, dintr-o microbiuretă, pînă la obținerea unei colorații albastre stabile. Se notează numărul de ml de soluție de iodat de potasiu utilizați pentru titrare.

Pentru obținerea unor rezultate corecte, determinarea activității polifenoloxidazei se repetă în 5 probe paralele. Proba martor constă din aceiași reactivi, cu singura deosebire că enzima este inactivată prin adăugarea a 5 ml de acid sulfuric, soluție 10%, înainte de adăugarea la amestecul de reacție a soluției de acid ascorbic și pirocatechină.

Deoarece în preparatul polifenoloxidazei obținut după metoda extracțiilor repetate a materialului vegetal cu acetonă este prezentă și ascorbinoxidaza — enzimă care oxidează acidul ascorbic în prezența oxigenului — este necesar să se dozeze și activitatea acesteia. În acest scop se recomandă montarea unor probe de control suplimentare, care constau din aceiași reactivi ca și probele în care se dozează activitatea polifenoloxidazei, însă fără pirocatechină. Dozarea acidului ascorbic în exces în probele de control suplimentare se realizează după aceeași procedură ca și în probele cu polifenoloxidază.

Calculul rezultatelor. Fie 1,05 factorul soluției de iodat de potasiu, 22,4 ml de KIO_3 consumați pentru titrarea probelor de control (media a cel puțin 2 probe paralele), 12,8 ml iodat de potasiu utilizați pentru tratarea probelor în care s-a determinat activitatea polifenoloxidazei (media a 5 determinări paralele) și 21 ml de KIO_3 folosiți pentru titrarea probelor de control suplimentar (activitatea ascorbinoxidazei).

Pentru titrarea acidului ascorbic în probele în care s-a determinat activitatea polifenoloxidazei s-au utilizat:

$(22,4 \times 1,05) - (12,8 \times 1,05) = 10,08$ ml KIO_3 $N/100$, iar pentru titrarea acidului ascorbic în probele în care s-a determinat activitatea ascorbinoxidazei:

$(22,4 \times 1,05) - (21,0 \times 1,05) = 1,47$ ml KIO_3 $N/100$.

Un mililitru de soluție $N/100$ de KIO_3 corespunde la 0,88 mg de acid ascorbic. În consecință, polifenoloxidaza, timp de 2 minute, a oxidat o cantitate de acid ascorbic egală cu:

$(10,08 \times 0,88) - (1,47 \times 0,88) = 7,58$ mg acid ascorbic.

Dacă inițial, pentru dozarea activității polifenoloxidazei, au fost recoltate, de exemplu, 0,058 g material vegetal, activitatea enzimei exprimată în mg acid ascorbic/gram de extract acetonic/2 minute va fi egală cu 130 mg.

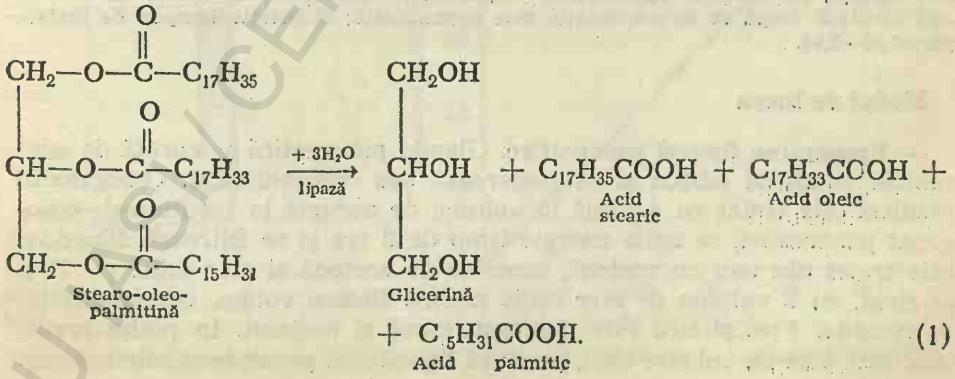
Observații. Activitatea polifenoloxidazei variază în funcție de natura materialului vegetal, de perioada de vegetație și de organul vegetativ care a fost recoltat pentru experiență (frunze, tulpini, muguri, boboci florali etc.).

2.4.12. DETERMINAREA ACTIVITĂȚII LIPAZEI

2.4.12.1. Metoda Rona și Michaelis

Lipazele sînt enzime sub acțiunea cărora lipidele neutre (gliceridele) sînt hidrolizate cu formare de acizi grași liberi și glicerină. Lipazele se întîlnesc în sucul gastric, sucul pancreatic, în semințele de in, mac, de *Sysymbrium officinale*, de *Sinapis alba*, *Ricinus communis*, în sînge, în serul sanguin etc.

Activitatea enzimatică maximă a lipazelor de diferite proveniențe variază în funcție de *p*H. Astfel, lipazele sucului gastric înregistrează un maximum de activitate între *p*H = 6,3 (lipaza sucului gastric al caninelor) și *p*H = 8,6 (lipaza sucului gastric de cal), în timp ce lipazele de origină vegetală manifestă o activitate maximă în mediu acid *p*H 4,7—5,0. Reacția de hidroliză enzimatică a gliceridelor decurge după ecuația (1):



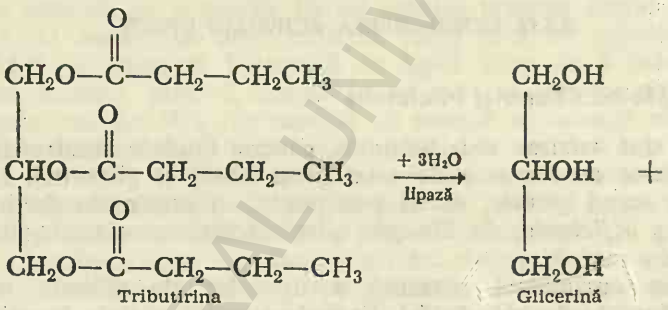
(1)

Lipazele hidrolizează, de asemenea, și esterii alcoolilor primari. Esterii alcoolului etilic cu acizii grași sînt hidrolizați cu aceeași viteză ca și lipidele neutre (gliceridele) (2):

$$\underset{\text{Acetat de etil}}{CH_3COOC_2H_5} \overset{\text{lipază}}{\underset{+H_2O}{\rightleftharpoons}} \underset{\text{Acid acetic}}{CH_3COOH} + \underset{\text{Alcool etilic}}{C_2H_5—OH} \qquad (2)$$

Lipazele tractului gastro-intestinal au un *p*H optim cuprins între 7,90 și 8,00 și acțiunea lor este stimulată de prezența bilei.

Principiul metodei se bazează pe proprietatea soluției de tributirină de a schimba, sub acțiunea lipazei, tensiunea superficială a soluției. Tributirina micșorează tensiunea superficială, în timp ce produșii hidrolizei enzimatice — acizii grași și glicerină — nu au asupra acesteia nici o influență. Tensiunea superficială a soluției este măsurată înainte și după acțiunea enzimei asupra substratului, și unitatea activității lipazei este exprimată în unități lipazice/oră (3):



$$+ \underset{\text{Acid butiric}}{3CH_3—CH_2—CH_2COOH} \qquad (3)$$

Reactivi necesari: 1) Tributirină, soluție saturată; 10—15 picături de tributirină sînt agitate, cu ajutorul agitatorului magnetic, în decurs de 3—4 ore, cu 1 l de apă distilată. După 48 de ore soluția este neutralizată; 2) Soluție tampon de fosfați, *p*H=7,96—8,04.

Modul de lucru

— **Prepararea lipazei pancreatice.** Glanda pancreatică se curăță de aderențele țesutului adipos și se mojarează sau omogenizează. Omogenatul rezultat este tratat cu acetonă (5 volume de acetonă la 1 volum de omogenat pancreatic), se agită energic timp de 2 ore și se filtrează. Reziduul este tratat din nou cu acetonă, amestec de acetonă și eter etilic (1 : 1) și în final, cu 2 volume de eter etilic pentru fiecare volum, corespunzător, de reziduu. Precipitatul este degresat, uscat și mojarat. În pudra rezultată, care este de culoare albă, pe lîngă lipază sînt prezente și alte enzime.

Soluția enzimei se prepară în glicerină. Se dizolvă 1 g de lipază în 100 ml de glicerină și soluția se lasă în repaus timp de 3—4 ore, în termostat, la 30°C.

— **Calibrarea stalagmometrului.** Stalagmometrul, care este o pipetă specială gradată și prevăzută cu bulă (fig. 37), este calibrat cu ajutorul soluțiilor de tributirină de diferite concentrații (20; 40; 60; 80 și 100%) și cu apă distilată. Calibrarea se efectuează astfel: se introduce în stalagmometru soluția cu care acesta urmează să fie calibrat și picăturile care se formează prin evacuarea stalagmometrului sînt numărate. Cu aceeași soluție se fac două determinări, și pentru construirea curbei etalon se folosește media.

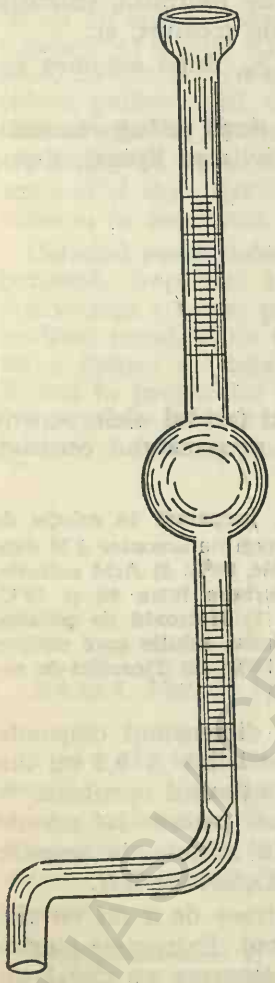


Fig. 37. Stalagmometru.

Exemplu. În cazul calibrării stalagmometrului cu apă distilată, numărul picăturilor a fost de 103; pentru soluția de 20% tributirină 124; 40%—143; 60%—162; 80%—180 și pentru soluția de tributirină 100%—197 de picături. Scăzînd valorile medii obținute pentru martor (apa distilată), se obțin valorile reale pentru soluții de diferite concentrații de tributirină. Se construiește curba etalon, înscriindu-se pe ordonată numărul de picături obținut pentru calibrarea stalagmometrului și pe abscisă, concentrația tributirinei în soluția utilizată pentru calibrare (fig. 38).

— **Determinarea activității lipazei pancreatice.** Într-un balon Erlenmeyer se pun cu pipeta 2 ml de enzimă, 50 ml soluție saturată de tributi-

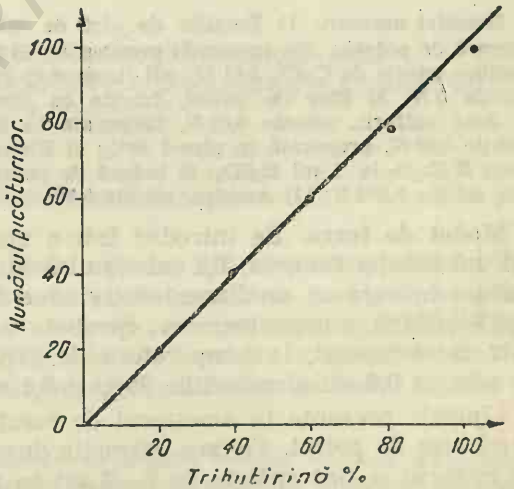


Fig. 38. Curba de calibrare a stalagmometrului.

rină şi 2 ml soluţie tampon de fosfaţi. Se determină imediat (I) numărul de picături cu ajutorul stalagmometrului. Amestecul din balonul Erlenmeyer este introdus într-un termostat la 37°C şi lăsat în repaus timp de 1 oră, după care se determină din nou numărul de picături.

Activitatea enzimei exprimată în unităţi lipazice este calculată după formula:

$$C = \frac{(A - B)}{5},$$

unde:

A este cantitatea de tributirină (în %) înainte de hidroliză, calculată cu ajutorul curbei etalon după numărul de picături, şi

B — concentraţia de tributirină, exprimată în %, după acţiunea enzimei.

Exemplu. Numărul de picături, măsurat imediat după adăugarea enzimei a fost de 154, iar după 1 oră — de 116. Activitatea lipazei, ţinînd seama de valoarea martorului, va fi:

$$\frac{51 - 12}{5} = 7{,}8 \text{ unităţi lipazice/h.}$$

2.4.12.2. Metoda cu bicromat de potasiu

Principiul metodei. Acizii graşi superiori (acidul oleic, stearic şi palmitic) rezultaţi după acţiunea lipazei asupra preparatului cercetat, sînt extraşi cu solvenţi organici şi dozaţi titrimetric.

Reactivi necesari: 1) Emulsie de ulei de măsline, 10%, preparată în soluţie de clorură de potasiu, 2% (proaspăt preparată); 2) Soluţie tampon de amoniac 3 *M* care conţine soluţie de $CaCl_2$ 0,01 *M*; *p*H final=8,0; 3) Alcool etilic, 96%; 4) Acid sulfuric, soluţie 3 *N*; 5) Eter de petrol, fracţia cu punctul de fierbere între 40 şi 70°C; 6) Acid sulfuric, soluţie 0,02 *N*, preparată în alcool 30%; 7) Hidroxid de potasiu, soluţie 0,05 *N*, preparată în alcool 40%; 8) Bicromat de potasiu, soluţie care conţine 1 mg $K_2Cr_2O_7$ la 1 ml H_2SO_4; 9) Iodură de potasiu, soluţie 10%; 10) Tiosulfat de sodiu, soluţie 0,005 *N*; 11) Amidon, soluţie 0,5%.

Modul de lucru. Se introduc într-o eprubetă de dimensiuni obişnuite 0,1 ml soluţie tampon, 0,2 ml emulsie de ulei de măsline şi 0,2 ml din soluţia în care se analizează activitatea lipazei. Conţinutul eprubetei se agită pentru omogenizare şi eprubeta se introduce pentru 10 minute într-un termostat, la temperatura de 37°C. După 10 minute, la amestec se adaugă 0,6 ml alcool etilic 96% şi 0,1 ml de H_2SO_4 soluţie 3 *N*.

Lipidele prezente în amestecul de reacţie sînt extrase de 2 ori cu cîte 5 ml eter de petrol. Fiecare extracţie durează 1 minut. Extractele eterice se reunesc şi sînt spălate de 2—3 ori în pîlnia de separare cu cîte 1 ml soluţie de acid sulfuric 0,02 *N*. Acizii graşi liberi, prezenţi în extractul

spălat, sînt extrași cu soluție de KOH 0,05 *N*, preparată în alcool etilic 40%. Prima extracție se realizează cu 2 ml KOH, a doua cu 1 ml.

Cele două extracte alcaline ale acizilor grași sînt reunite într-un picnometru cu un volum total de 3 ml și volumul se aduce la semn cu soluție alcoolică de KOH. Din această soluție se recoltează două probe — între 0,2 și 1 ml soluție — în eprubete din sticlă Pyrex (20×200 mm) și se evaporă la sec, într-un termostat, la temperatura de 125±10°C. După evaporare la sec se introduc în ambele probe 3 ml soluție bicromat de potasiu. Eprubetele sînt acoperite cu pere de sticlă și introduse într-o baie de apă în clocot, timp de 50—60 de minute. După răcire, într-un curent de apă de robinet, conținutul eprubetelor se trece cu ajutorul a 50 ml de apă distilată rece într-un balon cotat de 200 ml. Se adaugă cu pipeta 2 ml soluție KI și după agitare se lasă în repaus la întuneric 10 minute. Se titrează cu soluție de tiosulfat de sodiu 0,005 *N* pînă la apariția culorii galbene pal, cînd la soluție se adaugă 1 ml amidon 0,5% și se titrează pînă la decolorare completă.

Probele de control (2) constă din aceiași reactivi, inclusiv preparatul enzimei și sînt titrate imediat după pregătire, fără a mai fi necesară incubarea în termostat.

Calculul rezultatelor. Diferența dintre media probelor de control și experiență, împărțită la 60, indică numărul de miligrame de acid oleic. Activitatea enzimei poate fi exprimată și în micromoli de acid oleic, înmulțind numărul de miligrame de acid oleic cu coeficientul 3,55. *Activitatea lipazei se exprimă în μmol/1 ml soluție/minut.* Cînd activitatea lipazei în preparatul analizat este mică, de exemplu, în sînge, incubarea preparatului în termostat se prelungește ca timp între 10 minute și 60 de minute și rezultatul se exprimă în μmol acid oleic/1 ml sînge/1 oră.

2.4.13. DETERMINAREA ACTIVITĂȚII RIBONUCLEAZEI DUPĂ PRODUSELE ACIDOSOLUBILE ALE HIDROLIZEI ACIDULUI RIBONUCLEIC

2.4.13.1. Metoda Kunitz, modificată de Cepinoga

Principiul metodei. Sub acțiunea ribonucleazei, acidul ribonucleic este hidrolizat cu formare de produse care nu precipită în soluții acide. Activitatea ribonucleazei se reflectă prin creșterea cantității de produse acidosolubile în decursul perioadei de incubare a amestecului. Produsele acidosolubile sînt determinate după cantitatea de fosfor scindat de enzimă.

Reactivi necesari: 1) Acid ribonucleic; 2) Soluție tampon de acid acetic-acetat de sodiu 0,1 *M*, *p*H=5,0; 3) Ribonuclează, preparat; 4) Acetat de uranil, soluție 0,25%; 5) Acid tricloracetic, soluție 2,5%; 6) Acid sulfuric, concentrat.

Modul de lucru. Acidul ribonucleic, preparat din drojdia de bere după metoda Chantrenne, se dizolvă în soluție tampon de acid acetic-acetat de sodiu 0,1 *M* și *p*H=5,0. Soluția preparată trebuie să conțină 0,5 mg de fosfor anorganic într-un ml de soluție. Se recoltează două probe paralele, de cîte 1 ml soluție de acid ribonucleic, care sînt tratate cu cîte 1 ml soluție de ribonuclează, preparată în soluție tampon de acid acetic-acetat de sodiu 0,01 *M* și *p*H=4,0. În soluția de ribonuclează se recomandă ca proporția în azot proteic să varieze între 0,001 și 0,01 mg într-un ml de soluție. Probele sînt incubate timp de 10 minute, la 25°C, într-un termostat reglabil. După 10 minute, în ambele probe se adaugă cu o pipetă un volum egal de agent precipitant (2 ml soluție acetat de uranil 0,25% preparat în soluție de acid tricloracetic 2,5%) și probele sînt filtrate după 30 de minute. În paralel se pregătește și o probă de control, în care agentul precipitant este adăugat înainte de pipetarea soluției enzimatice. Din filtrate se recoltează probe de cîte 1 ml, care sînt mineralizate în prezența a 0,15 ml de acid sulfuric concentrat. În final se dozează fosforul anorganic rezultat după acțiunea enzimei asupra substratului.

Diferența dintre conținutul fosforului anorganic în proba de control și în proba cu preparat enzimatic reprezintă cantitatea de fosfor rezultată în urma hidrolizei parțiale a acidului ribonucleic sub acțiunea ribonucleazei. *Activitatea ribonucleazei se exprimă în miligrame de fosfor, hidrolizat timp de 10 minute și, raportat la 100 miligrame azot total al extractului de enzimă.*

Metoda Kunitz pentru determinarea activității ribonucleazei este utilizată pentru extractele tisulare și pentru omogenatele obținute din țesuturile animale.

2.4.13.2. Metoda turbidimetrică tehnica Houck

Principiul metodei. Metoda se bazează pe apariția opelescenței în urma reacției dintre acidul ribonucleic nehidrolizat (polielectrolit) și albumina serică acidulată. Gradul de opalescență este direct proporțional cu lungimea catenei polimerului.

Reactivi necesari: 1) Acid ribonucleic, soluție 0,04—0,06%; 2) Clorură de sodiu, soluție 0,15 *M*; 3) Reactiv pe bază de albumină serică.

Modul de lucru. Probe de cîte 1 ml soluție de acid ribonucleic 0,04—0,06%, preparată în soluție de clorură de sodiu 0,13 M care conține și fosfat disodic, a cărui concentrație finală în soluție este de 0,2 *M* (*p*H-ul soluției finale=7,6), sînt tratate cu 5 ml de reactiv care provoacă opalescența. Compoziția acestui reactiv este următoarea: 0,3 mg albumină serică sînt dizolvate într-un mililitru de soluție tampon acid acetic-acetat

de sodiu $pH=4,0$. Pentru a se asigura stabilitatea opalescenței soluției în fiecare probă se adaugă pentru fiecare mililitru de soluție 1 mg de gelatină.

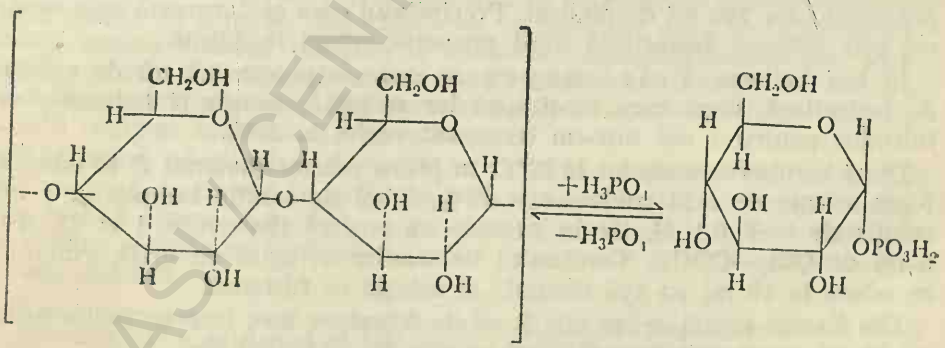
Pentru dozarea activității ribonucleazei este necesară obținerea unei curbe etalon cu ajutorul unui preparat de ribonuclează cristalizată (v. capitolul Proteine). Probele sînt citite la fotoelectrocolorimetru (FEK-57) la lungimea de undă de 400 mμ.

Curba etalon se realizează în felul următor: la 0,5 ml de soluție, care conține 500 μg de acid ribonucleic, se adaugă 0,5 ml soluție tampon clorură de sodiu-fosfat disodic, în care concentrația ribonucleazei cristalizate obținute din pancreas variază între 10 și 50 μg. Se prepară o gamă de probe în care se variază numai cantitatea de ribonuclează. Probele sînt incubate 5 minute la 37°C. Valorile absorbției citite la fotoelectrocolorimetru sînt convertite cu ajutorul curbei etalon în μg de acid ribonucleic. Diferența dintre valoarea inițială și valoarea aflată după incubare reprezintă cantitatea substratului care a fost depolimerizat sub influența ribonucleazei.

În cazul determinării activității ribonucleazei în urină și sînge este necesară diluarea acestor lichide biologice de 100 de ori, iar în cazul sputei și lichidului cefalorahidian se recomandă o diluție maximă de 10 ori.

2.4.14. DETERMINAREA ACTIVITĂȚII FOSFORILAZEI. METODA CORI ȘI COLABORATORII

Glicogenul din țesuturile animale în prezența fosfatului anorganic și fosforilazei este esterificat cu formare de glucoză-1-fosfat sau „esterul lui Cori" (1). Enzima care catalizează această reacție este larg răspîndit în regnul animal și vegetal, întîlnindu-se în mușchi, inimă, ficat, creier, în drojdie de bere, în plantele superioare, cartofi, leguminoase etc.



Reacția de esterificare este reversibilă și este catalizată de fosforilază. Sinteza glicogenului a fost demonstrată în experiențele în care s-a uti-

lizat fosforilaza extrasă din țesutul hepatic, muscular și din cord. Fosforilaza obținută din țesuturile vegetale catalizează sinteza amidonului.

Principiul metodei se bazează pe determinarea acidului fosforic, prezent în mediul de reacție, care participă la reacțiile de fosforilare, activitatea enzimei exprimîndu-se în mg de fosfor esterificat raportate la unitatea de timp.

Reactivi necesari: 1) Molibdat de amoniu, soluție 2,5% preparată în soluție 5 *N* de H_2SO_4; 2) Soluție standard de fosfat (se dizolvă 0,1099 g de KH_2PO_4 p.a. într-un litru de apă distilată), 1 ml de soluție standard conține 0,025 mg de fosfor; 3) Florură de sodiu, soluție 0,1 *M*; 4) Acid ascorbic, soluție care conține 2 mg de acid ascorbic în 1 ml de soluție; 5) Acid tricloracetic, soluție 10%; 6) Amidon, soluție 3%; 7) Soluție tampon (se amestecă 60 ml de soluție tampon *N*/10 de fosfați pH=7,2 cu 100 ml de soluție 0,9% de NaCl și 1 ml de soluție 0,8% de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$).

Modul de lucru

Prepararea fosforilazei după Hanev. 120 g de boabe de mazăre sînt macerate într-un mojar, în prezența nisipului de cuarț, pînă la obținerea unei pudre fine. Maceratul este trecut cantitativ, cu ajutorul a 20—25 ml de eter etilic, într-un balon Erlenmeyer și extras de 2—3 ori cu cîte 100 ml de eter etilic pentru îndepărtarea lipidelor. Materialul astfel degresat este uscat pe o hîrtie de filtru pînă la evaporarea completă a solventului și este dizolvat în 400 ml de apă distilată. Pentru extracția fermentului, amestecul se lasă timp de 28—32 de ore, la temperatura de 2°C, agitîndu-se periodic cu o baghetă de sticlă. În scopul prevenirii dezvoltării microflorei în timpul extragerii enzimei, la amestec se adaugă 8—10 ml de toluen.

După 28—32 de ore, amestecul este filtrat și partea alicotă este dializată într-un sac de celofan, timp de 10 ore, într-o baie de apă distilată. Dializa se continuă încă 10—12 ore într-un curent de apă creat cu ajutorul unui termostat Höpler. La soluție se adaugă 15—20 g de caolin pentru fiecare 100 ml de dializat. Precipitatul care se formează este separat prin filtrare, fosforilaza fiind prezentă numai în filtrat.

În trei baloane Erlenmeyer se pun cu pipeta 0,5 ml de soluție de fosforilază, după care conținutul lor se agită energic și baloanele se introduc pentru 1 oră într-un termostat reglat la 37°C.

După incubarea probelor la 37°C, în proba martor (balonul 3) se adaugă 5 ml soluție de acid tricloracetic 10%, 2 ml de soluție tampon și 1 ml soluție de NaF 0,1 *M*, iar în probele cu enzimă (baloanele 1 și 2), cîte 5 ml de CCl_3—COOH. Conținutul baloanelor se agită cu grijă, volumul se aduce la 10 ml cu apă distilată și soluția se filtrează.

Din fiecare probă se iau cîte 2 ml de filtrat, se trec într-un balon cotat de 25 ml, și apoi se adaugă 1 ml soluție de acid ascorbic.

Conținutul baloanelor cotate se agită energic și după 30 de minute se aduce la semn cu apă distilată. Probele sînt colorimetrate la colorimetrul

Duboscq și cantitatea de fosfor se exprimă în mg. În acest scop se realizează o probă martor-standard, față de care se efectuează citirea la colorimetrul Duboscq.

Într-un balon cotat de 25 ml se pun cu o pipetă 2 ml de soluție standard de KH_2PO_4, 1 ml soluție de molibdat de amoniu, 2,5% și 1 ml soluție de acid ascorbic (care conține 2 mg de acid ascorbic la ml de soluție). Conținutul balonului se aduce la semn cu apă distilată.

Calculul rezultatelor. Dacă înălțimea martorului o notăm cu h_0, înălțimea citită pentru proba martor standard, h_1, și pentru proba de cercetat, h_2, activitatea fosforilazei prezente în 0,5 ml de extract va fi egală cu:

$$\frac{h_0 \times 0{,}005 \times 5 \times 5}{h_1} - \frac{h_0 \times 0{,}005 \times 5 \times 5}{h_2} = „x" \text{ mg},$$

unde 0,005 este cantitatea de fosfor, exprimată în mg, în proba martor-standard.

2.4.15. DETERMINAREA ACTIVITĂȚII FOSFATAZEI ACIDE ȘI FOSFATAZEI ALCALINE. METODA HUGGINS ȘI TALALAY

Fosfatazele sînt enzime prezente în mod practic în toate celulele organismelor vii. Un studiu deosebit de amănunțit a fost realizat asupra fosfatazelor din țesutul osos, sînge, plasmă, eritrocite, leucocite, ficat, rinichi, epiteliul intestinal, urină, micelii de fungi, lapte etc. În prezent, clasificarea fosfatazelor rămîne discutabilă, criteriile ei nerezolvînd multitudinea de proprietăți, moduri de acțiune, substrate specifice asupra cărora acționează, *p*H-ul la care activitatea enzimelor este maximă, ioni care activează sau inhibă acțiunea fosfatazelor etc.

Fosfatazele hidrolizează esterii fosforici cu formare de acid ortofosforic. După modul de acțiune, sînt clasificate în fosfataze specifice, care hidrolizează numai anumiți compuși ai fosforului (adenozintrifosfataza acționează exclusiv asupra acidului adenozintrifosforic cu formare de fosfat și acid adenozindifosforic) și *fosfataze nespecifice*, care hidrolizează cei mai diferiți compuși organici ai fosforului.

Fosfatazele nespecifice, după *p*H-ul la care activitatea lor hidrolitică este maximă, se împart în *fosfataze acide* (*p*H=5,1—6,0) și *fosfataze alcaline* (*p*H-ul optim=8,4—9,1). În prezenta metodă se descrie modalitatea de dozare a ambelor fosfataze în serul sanguin și în urină, folosindu-se același substrat.

Reactivi necesari: 1) Acid aminoacetic (glicină), soluție tampon. Se dizolvă 9,19 g de glicină și 7,17 g de clorură de sodiu în apă distilată, la care se adaugă 15 ml de soluție concentrată de hidroxid de sodiu și aproximativ 400 ml de apă distilată. (Soluția concentrată de hidroxid de sodiu se prepară prin dizolvarea a 100 g de NaOH necarbonatat în 100 ml de apă distilată.) La soluția astfel preparată se adaugă

40 g de pirofosfat de sodiu ($Na_4P_2O_7 \cdot 10H_2O$), şi volumul se aduce la 1 l cu apă distilată. Se aduce *p*H-ul soluţiei tampon de glicină la 11,2; 2) Fenolftaleină, soluţie-stoc. Se dizolvă 100 mg de fenolftaleină în 100 ml de alcool etilic 95%. Soluţia se păstrează în flacoane închise ermetic; 3) Soluţie substrat, preparată în soluţie tampon acidă. 11,70 g de acetat de sodiu $CH_3COONa \cdot 3H_2O$ şi 0,79 ml de acid acetic glacial (99%) se dizolvă în apă distilată (aproximativ 500—600 ml). Ulterior, se adaugă 0,608 g de fenolftaleinfosfat (sarea de sodiu) şi volumul final al soluţiei se aduce la 1 l cu apă distilată. Pentru păstrarea în bune condiţii a soluţiei se adaugă cu o pipetă 7,5 ml de cloroform şi soluţia se conservă în frigider. Soluţia astfel preparată corespunde unei concentraţii de 0,001 *M* şi *p*H=5,4; 4) Soluţie substrat, preparată în soluţie tampon alcalină. Într-un litru de apă distilată se dizolvă 20,6 g de barbital de sodiu şi 0,608 g de fenolftaleinfosfat (sarea de sodiu). Se pun cu pipeta 7,5 ml de cloroform şi se conservă în frigider. *p*H-ul soluţiei este 9,7.

Modul de lucru

Prepararea extractului de fosfatază vegetală. Seminţele de grîu, orz, porumb etc. sînt mojarate, iar făina este extrasă timp de 24 de ore cu ajutorul unei soluţii de $CaCl_2$ 0,2%. După extracţie, soluţia este centrifugată *(filtrarea este contraindicată!)* şi partea alicotă este folosită pentru dozarea fosfatazei acide. Fosfataza alcalină este absentă în seminţele cerealelor.

Pentru dozarea fosfatazei alcaline şi a fosfatazei acide se pot folosi următoarele preparate biologice: urină dializată pentru îndepărtarea substanţelor cromogene, ser sanguin, extractul vegetal al fosforilazei acide etc. Eşantioanele în care urmează să se dozeze activitatea enzimei se introduc într-o baie de apă-termostat la 37°C.

În eprubete paralele se măsoară cu o pipetă 5 ml de substrat tampon adecvat pentru fosfataza care urmează să fie dozată: pentru fosfataza acidă, soluţia *3* (v. reactivi), pentru fosfataza alcalină — soluţia *4*, şi probele se introduc în baia-termostat, pentru 5 minute. În fiecare probă se pune cu o pipetă 0,5 ml de soluţie-enzimă şi după agitare, amestecul este incubat timp de 1 oră la 37°C, după care, la conţinutul probelor se adaugă cu o pipetă 4,5 ml de soluţie tampon de glicină şi intensitatea coloraţiei probelor este imediat (!) măsurată la lungimea de undă de 550 mμ.

Pentru colorimetrarea probelor se folosesc soluţiile martor (proba de control):

— soluţia martor-substrat constă dintr-un amestec de 5 ml de fenolftaleinfosfat, 4,5 ml de soluţie tampon de glicină şi 0,5 ml de apă distilată;

— soluţia martor-enzimă este un amestec de 4,5 ml de tampon de glicină, 0,5 ml extract enzimatic şi 5 ml de apă distilată.

Pentru selecţionarea lungimii de undă corespunzătoare la care urmează să se citească probele şi valorile E sînt maxime, atît pentru probele martor cît şi pentru probele în care se dozează activitatea enzimei se recomandă realizarea curbei de absorbţie. În acest scop, se citesc la fotometru (sau la spectrofotometru) valorile densităţii optice pentru probe etalon

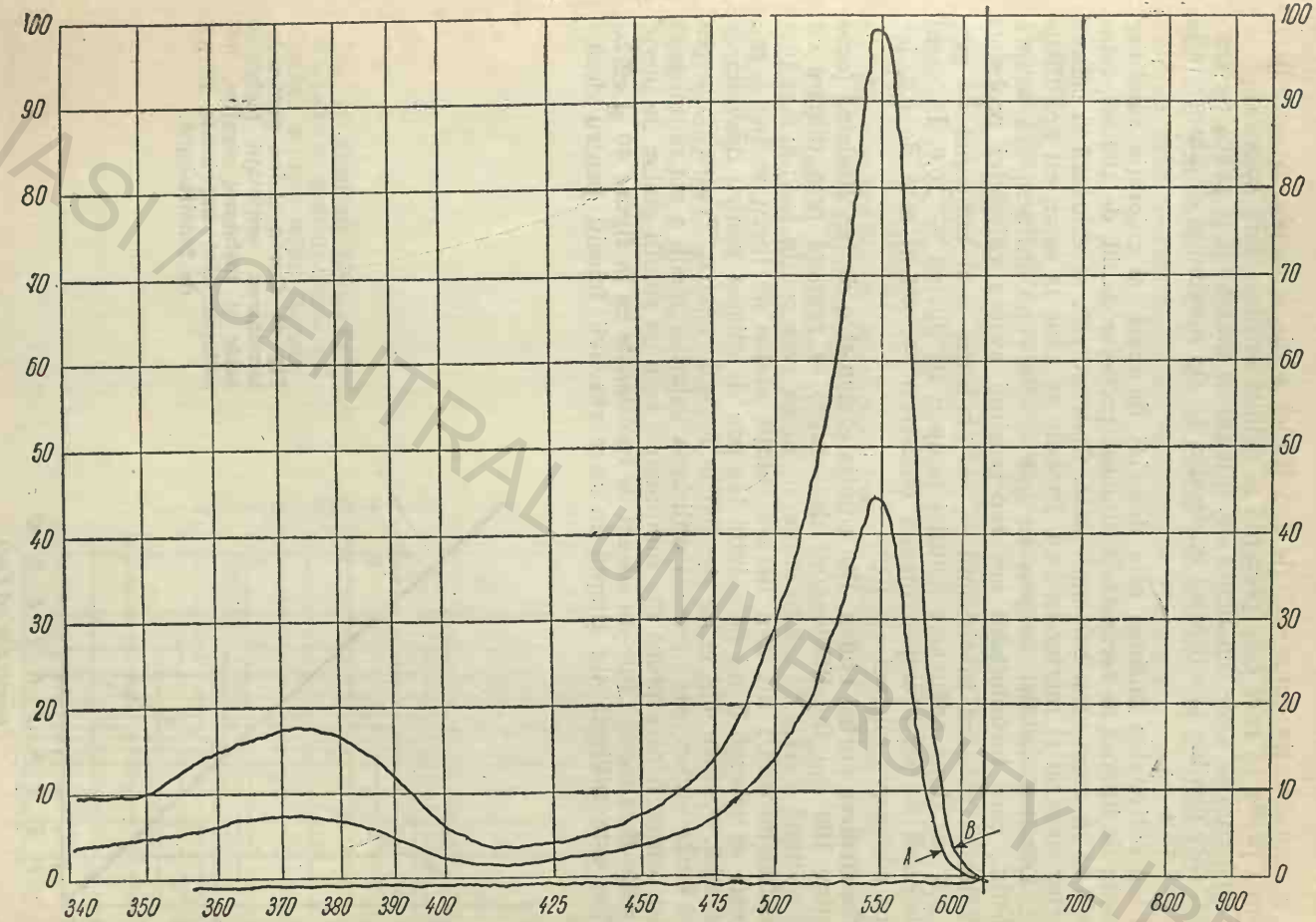


Fig. 39. Curba de absorbţie a probelor de fenolftaleină de diferite concentraţii:
A — curba de absorbţie a probei martor care conţine şi substratul utilizat; *B* — curba de absorbţie a eşantionului de cercetat care conţine şi extractul enzimatic.

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

cu o concentrație cunoscută de fenolftaleină (de exemplu, 5 μg/ml) și pentru probe în care este prezentă și soluția enzimei fără substrat.

După cum se vede din figura 39, atît proba etalon cît și proba de analizat, care conține și extractul enzimatic, au un maximum de absorbție la $\lambda = 550$ mμ.

Cînd activitatea enzimei este deosebit de mare și colorația soluțiilor extrem de intensă se recomandă diluarea probelor de 50, de 100 ori, folosindu-se în acest scop baloane cotate. Concomitent, se diluează și soluția martor-substrat și martor-enzimă. Probele se aduc la semn cu apă distilată. Diluarea soluției tampon cu apă distilată nu influențează asupra *p*H-ului, care incontestabil are repercusiuni asupra colorației probelor.

Valoarea *p*H-ului în sistemul — ser+substrat acid tamponat — este de 5,6, iar după adăugarea soluției tampon de glicină — 10,6. În cazul sistemului — ser+tampon alcalin (substrat) —, *p*H-ul este de 9,6, iar după adăugarea glicinei, de 10,9.

Construirea curbei etalon. Din soluția etalon-stoc de fenolftaleină (care conține 100 mg fenolftaleină/ml de soluție) se prepară prin diluare cu apă distilată o serie de soluții etalon de lucru, care conțin 1; 2; 5; 8 și 10 g fenolftaleinfosfat/1 ml. Din fiecare soluție etalon de lucru se iau 5 ml, la care se adaugă 5 ml de soluție tampon de glicină pentru dezvoltarea colorației. Probele sînt citite imediat la fotocolorimetru. Pentru obținerea unei curbe etalon este necesară utilizarea valorilor medii a cel puțin două citiri pentru fiecare probă din minimum 2 serii de soluții etalon de lucru. Valorile *E* se înscriu într-un sistem de coordonate ca în figura 40 și curba etalon este utilizată tot timpul în care reactivii folosiți pentru dozări

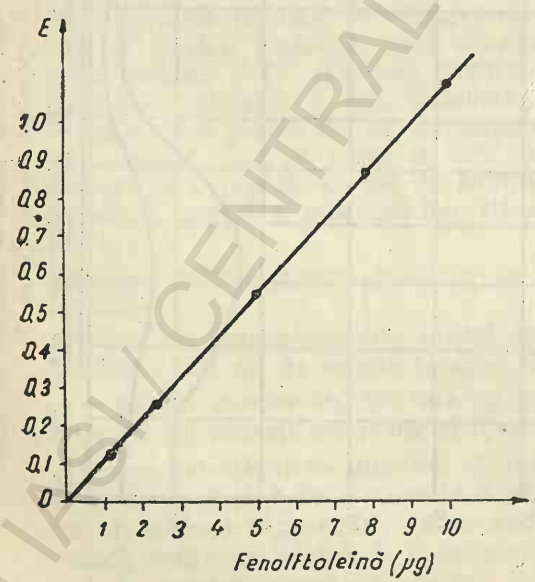


Fig. 40. Curba etalon pentru determinarea activității fosfatazei acide și fosfatazei alcaline. Rezultatele sînt exprimate în μg de fenolftaleină.

BCU IAȘI / CENTRAL

rămîn neschimbați. Prepararea din nou a unui reactiv sau înlocuirea unei soluții tampon reclamă refacerea completă a curbei etalon.

Calculul rezultatelor. Folosindu-se valorile citite pentru probele de cercetat (*E*) și curba etalon se calculează concentrația fenolftaleinei în mg la 1 l de extract-enzimă, de ser sanguin, de plasmă etc., după formula:

$$a \cdot \frac{10}{1\,000} \cdot \frac{100}{0{,}5},$$

unde:

a este cantitatea de fenolftaleină, în mg, eliberată în urma acțiunii enzimei;
10 — volumul final al amestecului enzima+substrat tamponat cu tampon de glicină;
1 000 — coeficient de calcul pentru 1 l de soluție de fenolftaleină;
100 — ml de ser;
0,5 — cantitatea de extract utilizat pentru determinarea activității enzimatice exprimată în ml.

Zece unități de enzimă hidrolizează timp de 1 oră și la 37°C o cantitate de fenolftaleinfosfat echivalentă cu 1 mg de fenolftaleină dozată în mediul de reacție.

Huggins și Talalay au întocmit pentru calcularea rezultatelor un grafic care permite citirea directă a activității fosfatazelor în cazul cînd cantitatea de fenolftaleină eliberată este cunoscută (fig. 41).

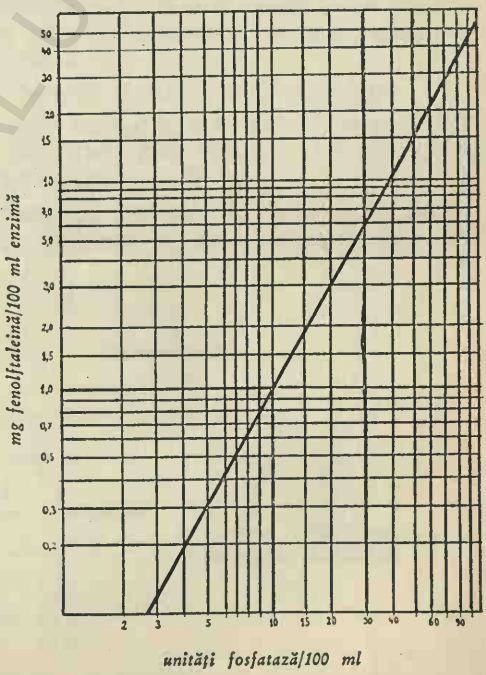


Fig. 41. Graficul Huggins-Talalay pentru citirea directă a activității fosfatazelor.

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Valoarea diagnostică. În sîngele şi plasma sanguină a pacienţilor normali adulţi, activitatea fosfatazei acide este aproximativ de 5—6 unităţi/100 ml de plasmă, în timp ce fosfataza alcalină are o activitate mai mare — 9—10 unităţi/100 ml de plasmă.

În urina pacienţilor normali, activitatea fosfatazei acide variază între 38 şi 56,4 unităţi/100 ml urină, iar a fosfatazei alcaline este mult mai scăzută — 1,5—5 unităţi/100 ml urină. În cazul cînd urina are o compoziţie normală şi cantitatea pigmenţilor cromogeni este corespunzătoare unei stări funcţionale normale, dozarea activităţii fosfatazei acide şi fosfatazei alcaline se realizează fără a fi necesară dializa prealabilă a urinei, operaţie absolut obligatorie în cazul utilizării ca substrat a fenilfosfatului (metoda King şi Armstrong).

Fosfatazele vegetale au un rol deosebit de important în procesul de germinare. Activitatea lor creşte paralel cu evoluţia procesului de creştere a plantelor tinere.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

CAPITOLUL

GLUCIDE

„Procesele chimice care se desfășoară în diferite organisme și, de asemenea, diversele reacții chimice de la nivelul unui singur organism au anumite trăsături comune. Aceasta ne determină să credem, că diferitele procese chimice, al căror sediu este materia vie, reprezintă de fapt modificări ale unui număr determinat de procese de bază".

KREBS, H. A. și KORNBERG, H. L.

3.1. NOȚIUNI GENERALE

Glucidele sînt substanțe larg răspîndite în regnul vegetal și animal. Părțile solide ale plantelor sînt formate mai ales din poliozide (celuloză, lignină etc.), care îndeplinesc funcția mecanică de susținere. În organismul animal se întîlnesc numai cîțiva reprezentanți ai acestei clase, dintre care glicogenul, glucoza, riboza și dezoxiriboza sînt cei mai importanți. În cantități relativ mici, în comparație cu alte componente celulare, glucidele au însă o importanță biologică deosebită.

După natura chimică, glucidele se împart în două mari categorii:

— monozaharide, cu formula generală $C_nH_{2n}O_n$, sînt glucidele care prin hidroliză nu pot fi descompuse în molecule mai simple care să posede proprietățile fizico-chimice caracteristice glucidelor și

— polizaharide, cu formula structurală generală $(C_6H_{10}O_5)n$, substanțe care prin hidroliză pot fi scindate cu formare de monozaharide (fig. 42).

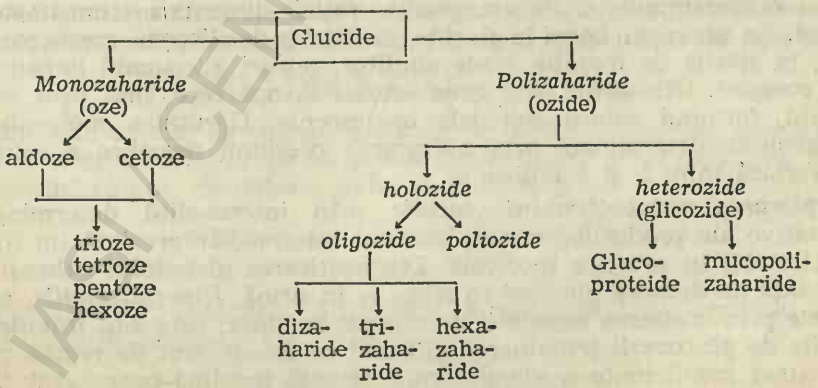


Fig. 42. Clasificarea glucidelor.

BCU IAȘI / CENTRUL UNIVERSITAR LIBRARY

Glucidele pot fi aldehide-alcooli sau ceto-alcooli. Avînd la origina lor alcooli polivalenţi, prin a căror oxidare ele pot fi obţinute în laborator, glucidele au şi un număr variabil de atomi de carbon, de regulă, egal cu numărul atomilor de carbon ai alcoolului polivalent din care sînt obţinute. Dintre monozaharide, cele mai importante sînt *hexozele* şi *pentozele*, care se întîlnesc în cazul animalelor şi plantelor fie în stare liberă, fie în compoziţia unor compuşi macromoleculari, de exemplu, în acizii nucleici.

Polizaharidele sînt substanţe cu o greutate moleculară mare (100 000—4 000 000), formate dintr-un număr considerabil de monozaharide. În majoritate, polizaharidele sînt substanţe amorfe, de culoare albă, insolubile în apă şi în soluţiile sărurilor neutre. Unii reprezentanţi ai polizaharidelor sînt uşor solubili în apă caldă, formînd soluţii pseudocoloidale.

În procesul de hidroliză a polizaharidelor se obţin monozaharidele din care acestea sînt formate. Produsele finale ale hidrolizei sînt d-glucoza, în cantităţi mari, d-fructoza, d-manoza, d-galactoza, d-arabinoza, d-xiloza etc. În hidroliza menajată a polizaharidelor pot fi obţinuţi şi produşi intermediari -tri- şi tetrazaharide.

Cele mai importante polizaharide vegetale sînt amidonul, inulina, pentozanele, substanţele mucinice şi pectice. Amidonul, produs final al procesului de asimilaţie clorofiliană, se acumulează sub formă de granule de amidon, cu striaţii concentrice caracteristice, îndeosebi în seminţe şi bulbi. Granulele de amidon nu sînt omogene; ele se compun din două substanţe diferite: amilopectina şi amiloza.

Amidonul este hidrolizat prin fierbere cu acizi minerali diluaţi şi în prima etapă rezultă dextrinele. Degradarea ulterioară a dextrinelor este însoţită de formare de d-glucoză, care este produsul final al hidrolizei complete a amidonului.

Glicogenul este un polizaharid animal, denumit frecvent şi amidon animal. Organul principal în care se acumulează glicogenul este ficatul. Glicogenul se găseşte în cantităţi mai mici în muşchi, pancreas, plămîni, rinichi, glande sexuale, sistemul nervos, ţesutul conjunctiv etc. Cantitatea de glicogen în ţesutul hepatic variază în funcţie de starea fiziologică a organismului şi de compoziţia raţiei alimentare consumate de animal. La un regim bogat în glucide, cantitatea de glicogen creşte considerabil, în stările de inaniţie scade simţitor, uneori glicogenul hepatic lipsind complet. Glicogenul este greu solubil în apă rece, însă uşor solubil la cald, formînd soluţii coloidale opalescente. Greutatea moleculară a glicogenului, determinată prin măsurarea presiunii osmotice a soluţiilor lui, variază între 1 şi 4 milioane.

Explorarea metabolismului glucidic prin intermediul determinărilor cantitative ale produşilor metabolismului intermediar prezintă un interes incontestabil în practica medicală. Diagnosticarea *diabetului zaharat* este precedată de dozarea glucozei în sînge şi în urină. *Hiperglicemiile*, caracterizate prin creşterea cantităţii de glucoză în sînge, care sînt întotdeauna însoţite de *glucozurii* (eliminarea glucozei în urină), sînt de regulă rezultatul unei insuficienţe a glandei care secretă insulină-pancreasul şi, în cazuri mult mai rare, ele se datoresc unui consum excesiv de glucide.

Glucozuriile a căror cauză este consumarea exagerată de dulciuri (zahăr, ciocolată, tort etc.) sînt denumite *glucozurii alimentare*. Acestea au un caracter temporar, în timp ce glucozuria patologică este permanentă. În clinică se cunosc și cazuri de eliminare masivă pe cale renală a pentozelor — *pentozurii*, care au însă o frecvență scăzută.

Determinarea cantitativă a glucidelor în diferite organe animale și vegetale este larg utilizată în practica de ameliorare și selecționare a raselor de animale și a noi soiuri de plante. Explorarea biochimică poate evidenția îmbunătățirile de ordin cantitativ survenite pe parcursul selecției, indicînd cercetătorului soiul mai corespunzător intereselor practicii agricole. Cercetînd cantitatea de amidon și glicogen în decursul perioadei de conservare a produselor agricole și animaliere, biochimistul poate recomanda condițiile în care păstrarea și conservarea alimentelor este mai avantajoasă și corespunzătoare. *Valorificarea produselor agricole în industria ușoară este precedată, de regulă, de analiza biochimică, care ajută pe practician în valorificarea rațională a materiei prime.*

3.2. PROPRIETĂȚI FIZICO-CHIMICE ALE GLUCIDELOR

3.2.1. REACȚII DE IDENTIFICARE A MONOZELOR ÎN LICHIDELE ȘI PREPARATELE BIOLOGICE

3.2.1.1. Reacția Trommer

Principiul reacției. Monozaharidele în mediu alcalin reduc oxidul cupric ($CuO \cdot H_2O$) cu formare de oxid cupros (Cu_2O), care se depune sub forma unui precipitat roșu-cărămiziu.

Mecanismul reacției este următorul: sulfatul de cupru reacționează cu hidroxidul de sodiu, formînd hidroxid cupric și sulfat de sodiu (reacția 1):

$$CuSO_4 + 2NaOH = Na_2SO_4 + Cu(OH)_2. \quad (1)$$

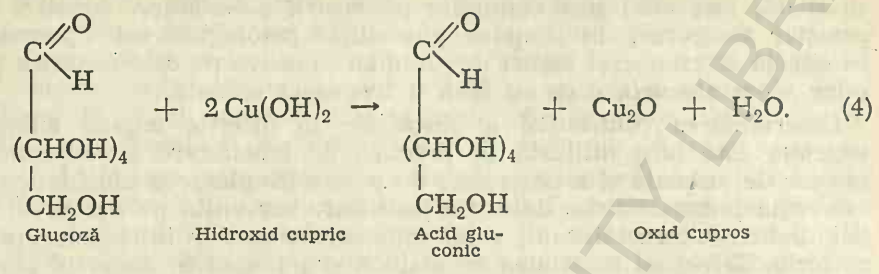
Hidroxidul cupric, de culoare albastră, în prezența glucozei, sau a altor monozaharide care au gruparea semiacetalică liberă și la cald, este redus la hidroxid cupros, de culoare galbenă (reacția 2):

$$2Cu(OH)_2 \longrightarrow \underset{\text{hidroxid cupros}}{2CuOH} + H_2O + O, \quad (2)$$

iar aceasta, prin încălzirea ulterioară, pierde apa transformîndu-se în oxid cupros de culoare roșie-cărămizie (3):

$$2CuOH \longrightarrow \underset{\text{oxid cupros}}{Cu_2O} + H_2O. \quad (3)$$

Reacţia globală cu participarea glucozei poate fi scrisă astfel (4):



După cum se vede din ecuaţia (4), în timpul reacţiei de reducere a hidroxidului cupric în oxid cupros, gruparea aldehidică a glucidului este oxidată, monozaharidul transformîndu-se într-un acid monocarboxilic (de exemplu, glucoza se transformă în acid gluconic).

Reacţia T r o m m e r, care se caracterizează prin formarea precipitatului roşu-cărămiziu de oxid cupros, poate fi mascată în cazul prezenţei unui exces de $Cu(OH)_2$, deoarece în timpul încălzirii, acesta pierde o moleculă de apă, trecînd în oxid cupric de culoare neagră (5):

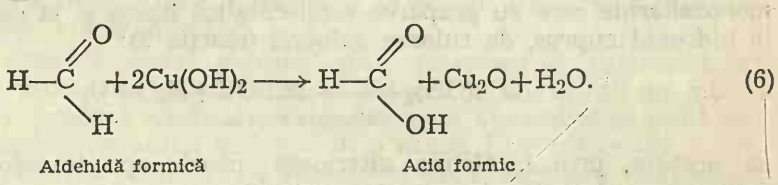
$$Cu(OH)_2 \longrightarrow CuO + H_2O. \qquad (5)$$

Reactivi necesari: Glucoză, soluţie 1%; 2) Maltoză, soluţie 1%; 3) Zaharoză, soluţie 1%; 4) Amidon, soluţie 1%, preparată în soluţie de NaCl; 5) Hidroxid de sodiu, soluţie 10%; 6) Sulfat de cupru, soluţie 2%; 7) Urină patologică.

Modul de lucru. În 5 eprubete numerotate se pun cu pipeta cîte 1—2 ml din soluţiile de glucoză, maltoză, zaharoză, amidon şi urină patologică, adăugîndu-se apoi în fiecare eprubetă un volum egal din soluţia de hidroxid de sodiu 1%. Se adaugă, dintr-o sticlă picătoare, soluţie de $CuSO_4$ 2% pînă la apariţia unei suspensii de hidroxid de cupru de culoare albastră.

Partea superioară a eprubetei, pînă la care a ajuns nivelul soluţiei, este apoi cu grijă încălzită la flacăra unui bec de gaz. Apare o coloraţie galbenă; încălzind în continuare, conţinutul eprubetei trece în roşu-cărămiziu, dovedind prezenţa zaharurilor reducătoare în soluţia de analizat.

Din principiul reacţiei T r o m m e r, expus mai sus, se deduce că reducerea hidroxidului cupric la oxid cupros poate fi caracteristică şi pentru alţi compuşi organici care au o grupare aldehidică liberă. Într-adevăr, reacţia este pozitivă şi în cazul folosirii unei soluţii de formaldehidă (6):



Proprietăţile reducătoare ale aldehidei formice sînt atît de puternic manifestate în această reacţie, încît concomitent cu formarea oxidului cupros roşu-cărămiziu se poate observa şi apariţia cuprului metalic.

Temă. Comparați rezultatele reacției de culoare obținute cu cele cinci soluții de analizat și explicați prezența sau absența precipitatului roșu-cărămiziu.

3.2.1.2. Reacția Fehling

Principiul reacției zaharurilor reducătoare cu licoarea Fehling este același ca cel descris mai sus pentru reacția Trommer.

Licoarea Fehling este o soluție în compoziția căreia intră sulfatul de cupru, hidroxidul de sodiu și tartratul dublu de sodiu și potasiu în proporții determinate. Prezența tartratului dublu de sodiu și potasiu în licoarea Fehling are o importanță deosebită, aceasta menținînd în soluție hidroxidul de cupru. Astfel se explică faptul că prin fierberea licorii Fehling nu se poate observa apariția oxidului cupric de culoare neagră.

Reactivi necesari: 1) Soluție Fehling I. Se dizolvă 40 g de $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ într-un litru de apă distilată; 2) Soluție Fehling II. Se dizolvă prin încălzire pe o baie de apă 346 g de sare Seignette (tartrat dublu de sodiu și potasiu) și 140 g de NaOH în 600—700 ml de apă distilată. Soluția se trece după răcire într-un balon cotat și se aduce la 1 l, cu apă distilată; 3) Soluțiile 1—4 și 7, utilizate pentru reacția Trommer.

Modul de lucru. Într-o serie de eprubete se pun cu pipeta cîte 1—2 ml din soluția de analizat (glucoză, maltoză, zaharoză, amidon, urină patologică etc.) și apoi se adaugă 1 ml de licoare Fehling (amestec proaspăt preparat din soluțiile Fehling I și Fehling II în proporție de 1 : 1). Conținutul eprubetelor se încălzește pînă la fierbere. Se notează și explică rezultatele reacției cu licoare Fehling.

În cazul unei cantități mici de glucoză în soluția de analizat (în lichidele biologice, de exemplu, în urină), după încălzire la fierbere, proba se răcește, oxidul cupros precipită după cîteva minute și poate fi ușor identificat.

Avantajul folosirii licorii Fehling pentru identificarea glucidelor reducătoare în probele de analizat constă în aceea că, deși se folosește un exces de reactivi, nu există posibilitatea de mascare a precipitatului de oxid cupros care se datora formării concomitente a oxidului cupric de culoare neagră.

Recomandarea de a prepara imediat înainte de utilizare amestecul de soluții Fehling I și Fehling II este condiționată de faptul că licoarea Fehling preparată cu cîteva zile înainte, prin încălzire, dă naștere unui precipitat roșu-cărămiziu, chiar și în cazul cînd zaharurile reducătoare sînt absente în soluție.

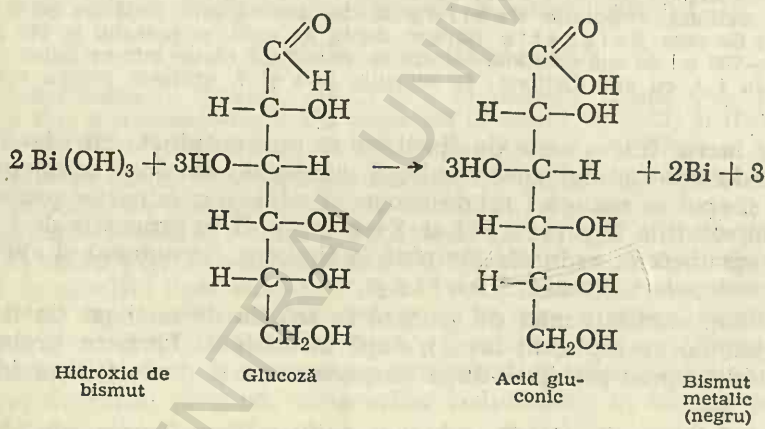
Reacția glucidelor care au gruparea semiacetalică liberă cu licoarea Fehling este utilizată în laborator pentru dozarea lor cantitativă în materialul biologic (v. 3.3).

Pentru identificarea zaharurilor reducătoare în practica de laborator se utilizează și reactivul Benedict, care reprezintă de fapt o variantă a licorii Fehling. Se dizolvă 86,5 g de citrat de sodiu cristalizat și 50 g de carbonat de sodiu anhidru, în aproximativ 350 ml de apă distilată. La soluția astfel obținută se adaugă 8,65 g de sulfat de cupru dizolvate prealabil în 50 ml de apă distilată. Soluția se agită energic și dacă nu este perfect limpede se filtrează. Se utilizează 0,4 ml de reactiv Benedict pentru fiecare 0,5 ml soluție de glucid 2% și amestecul se încălzește la fierbere timp de 2 minute.

3.2.1.3. Reacția Nylander

Principiul reacției. În prezența unui zahăr reducător, sarea de bismut, la cald, este redusă la bismut metalic de culoare neagră. Reacțiile care au loc sînt următoarele:

$$Bi(OH)_2NO_3 + NaOH = Bi(OH)_3 + NaNO_3 \qquad (1)$$



(2)

Reactivi necesari: 1) Reactivii 1—4 și 7 utilizați pentru reacția Trommer; 2) Reactiv Nylander. În 100 ml soluție de NaOH 10% se dizolvă 2 g $Bi(OH)_2NO_3$ și 4 g de sare Seignette. Soluția se încălzește pe o baie de apă, se răcește și se filtrează, îndepărtîndu-se precipitatul format.

Modul de lucru. Într-o eprubetă termorezistentă se pun cu o pipetă 1—2 ml din soluția de analizat sau de urină patologică și se adaugă 0,5—1 ml de soluție Nylander și 2 ml de apă distilată. Amestecul este încălzit 2 minute pînă la fierbere. La începutul fierberii apare un precipitat brun, care trece repede în negru.

Reacția Nylander pentru determinarea zaharurilor reducătoare în lichidele și materialul biologic este cea mai sensibilă dintre reacțiile descrise mai sus (Trommer și Fehling).

3.2.1.4. Reacția glucidelor reducătoare cu acetatul de cupru

Reactivi necesari: 1) Reactivii 1—4 și 7 folosiți pentru reacția Trommer; 2) Acetat de cupru, soluție 5%; 3) Acetat de sodiu, soluție 1%.

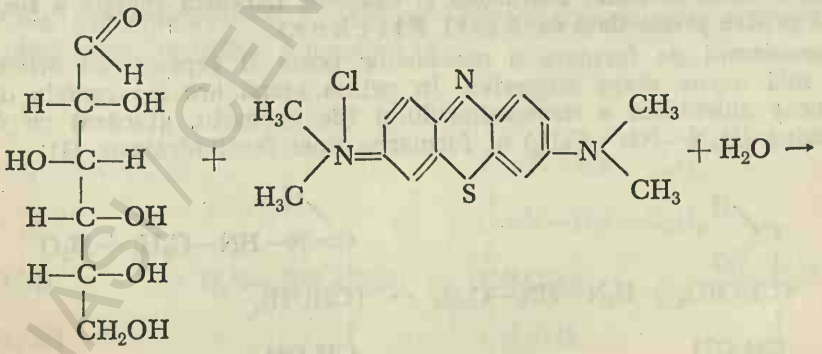
Modul de lucru. Într-o eprubetă se pun cu o pipetă 1 ml de soluție din glucidul de analizat sau de urină patologică și se adaugă 1 ml de soluție de acetat de cupru 5% și 0,5 ml de soluție de acetat de sodiu 1%. Conținutul eprubetei se agită energic și se încălzește pînă la fierbere la flacăra unui bec de gaz. Se formează un precipitat de Cu_2O.

Spre deosebire de reacțiile Trommer, Nylander și Fehling, reacția cu acetat de cupru se caracterizează prin aceea că oxidarea grupării aldehidice a zaharurilor se realizează nu în condițiile unui mediu alcalin, ci într-o soluție al cărui *p*H este apropiat de mediul neutru. În aceste condiții experimentale, dizaharidele reducătoare (maltoza, lactoza) nu sînt oxidate în mod practic, ceea ce permite deosebirea lor de monozaharide. Dacă însă încălzirea soluției continuă timp de 10 minute, dizaharidele sînt hidrolizate parțial și reacția devine, de asemenea, pozitivă.

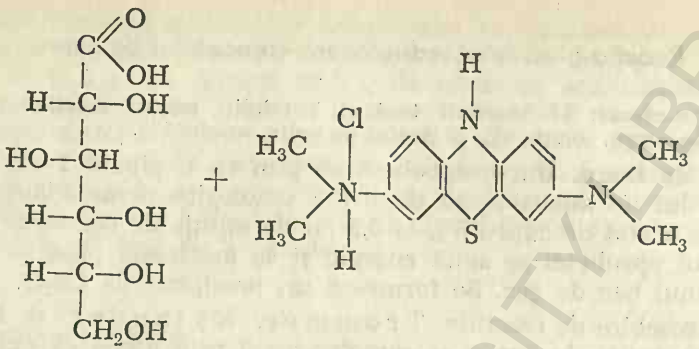
Această reacție poate fi realizată și cu ajutorul *reactivului* Barfoed, care se prepară astfel: se dizolvă 13,3 g de acetat de sodiu neutru cristalizat în 200 ml soluție de acid acetic 1%. Pentru prepararea unei cantități mai mari de reactiv, de exemplu, 1 l, se dizolvă 66 g de acetat de cupru în 10 ml acid acetic glacial și soluția se aduce la 1 l cu apă distilată.

3.2.1.5. Reacția cu albastrul de metilen

Principiul reacției. Glucidul reducător este oxidat cu formarea acidului respectiv, iar soluția de albastru de metilen este redusă cu formarea leucoderivatului incolor (1):



Glucoză — Albastru de metilen (1)



Acid gluconic

Leucoderivatul albastrului de metilen

Reactivi necesari: 1) Glucoză, soluție 1%; 2) Carbonat de sodiu, soluție 2%; 3) Albastru de metilen, soluție 1%.

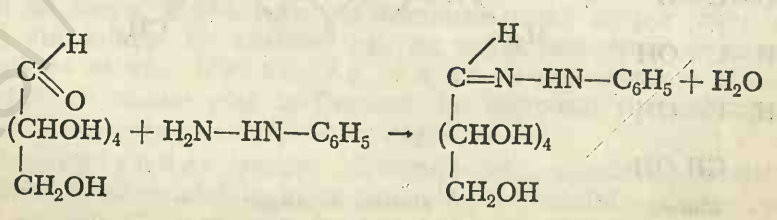
Modul de lucru. La 2 ml de soluție de glucoză 1% se adaugă 3 picături soluție de Na_2CO_3 2% și 5 picături soluție albastru de metilen 1%. Amestecul astfel obținut se încălzește pe o baie de apă. Se observă decolorarea treptată a conținutului eprubetei.

Forma redusă, incoloră a colorantului, în contact cu oxigenul din aer, cedează acestuia doi atomi de hidrogen cu formare de apă și reapariția formei colorate. Dacă soluția decolorată este răcită și barbotată cu aer se recolorează în nuanța albastră. Reîncălzirea soluției generează ciclul reacțiilor.

3.2.1.6. Reacția de formare a ozazonelor

Principiul reacției. Monozaharidele reducătoare reacționează cu fenilhidrazina, formînd hidrazone și ozazone. (Această reacție a fost descrisă pentru prima dată de Emil Fischer.).

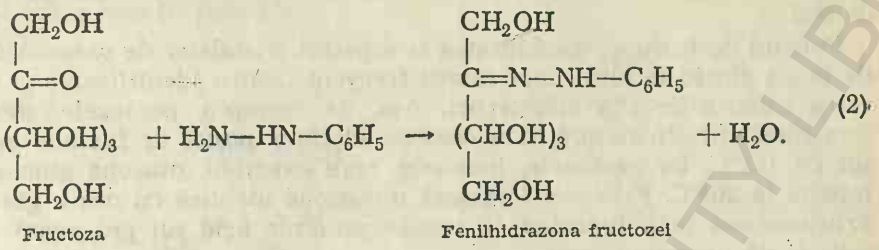
Mecanismul de formare a ozazonelor poate fi reprezentat schematic prin mai multe etape succesive. În prima etapă are loc reacția dintre gruparea aldehidică a monozaharidului (de exemplu, glucoza) cu fenilhidrazina ($H_2N—NH—C_6H_5$) și formarea unei fenilhidrazone (1):



Glucoza Fenilhidrazina Fenilhidrazona glucozei

(1)

Fructoza, care este o cetohexoză, reacționează cu fenilhidrazina la nivelul grupării cetonice (2):

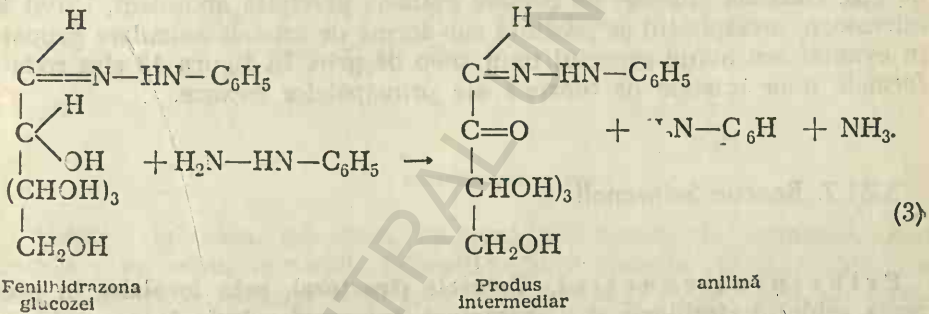


(2)

Fructoza — Fenilhidrazona fructozei

Fenilhidrazonele sînt substanțe incolore, ușor solubile în apă și care prin hidroliză în mediu puternic acid se descompun punînd în libertate monozaharidul inițial.

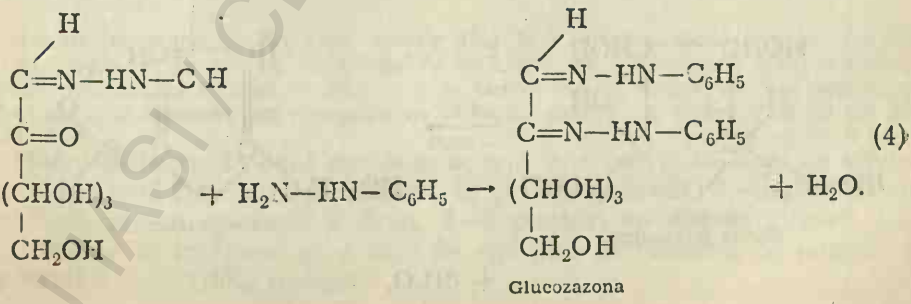
Fenilhidrazona monozaharidului reacționează cu o nouă moleculă de fenilhidrazină, cu oxidarea concomitentă a grupării alcoolice secundare de la cel de al doilea atom de carbon, în timp ce molecula de fenilhidrazină se descompune cu formare de anilină și amoniac (3):



(3)

Fenilhidrazona glucozei — Produs intermediar — anilină

Produsul intermediar care s-a format reacționează cu a treia moleculă de fenilhidrazină, rezultînd o ozazonă (4):



(4)

Glucozazona

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Ultima reacție (4) are loc numai în mediu acid. Obținerea cristalelor de osazonă se realizează prin adăugarea la mediul de reacție a clorurii de sodiu, în soluție saturată, amestecul obținut încălzindu-se apoi pe o baie de apă.

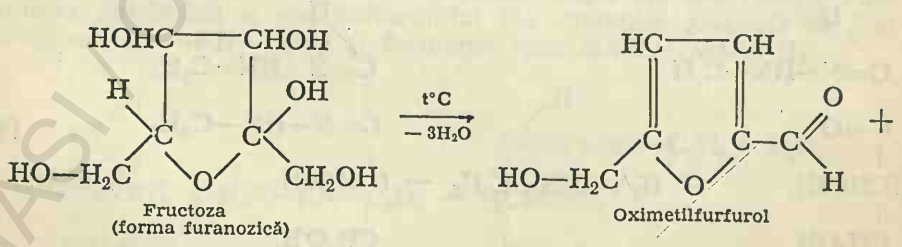
Punctul de fuziune, solubilitatea și aspectul cristalelor de osazonă diferă de la un glucid la altul, fapt folosit frecvent pentru identificarea și separarea zaharurilor din amestecuri. Așa, de exemplu, pentozele, zaharuri larg răspîndite în natură, dau osazone al căror punct de fuziune este în jur de 150°C, iar osazonele, hexozele, spre exemplu, osazona glucozei se topește la 208°C. Fructoza formează o osazonă identică cu cea a glucozei. Fructuzazona prin hidroliză în mediu puternic acid nu generează fructoză, ci dă naștere glucozei.

Reactivi necesari: 1) Glucoză, soluție 1%; 2) Fructoză, soluție 1%; 3) Clorură de sodiu, soluție saturată; 4) Acid acetic concentrat; 5) Fenilhidrazină, soluție.

Modul de lucru. Într-o eprubetă uscată se măsoară cu o pipetă 2 ml soluție de glucoză 1%, la care se adaugă 1 ml de soluție saturată de NaCl, 3 picături de CH_3COOH concentrat și 3 picături de soluție fenilhidrazină. Conținutul eprubetei se încălzește timp de 15—20 de minute pe o baie de apă. Osazona glucozei de culoare galbenă precipită abundent. Privit la microscop, precipitatul se prezintă sub formă de cristale aciculare grupate în evantai sau avînd aspectul unui snop de grîu. În figura 43 sînt redate formele unor cristale de osazonă ale principalelor hexoze.

3.2.1.7. Reacția Seliwanoff

Principiul reacției. Cetozele (fructoza), prin încălzire în prezența acidului clorhidric și a rezorcinei, colorează soluția în roșu-vișiniu sau în roșu. Reacția Seliwanoff este specifică pentru cetoze, permițînd cercetătorului identificarea separată a acestora în amestecuri de cetohexoze și aldohexoze (1):

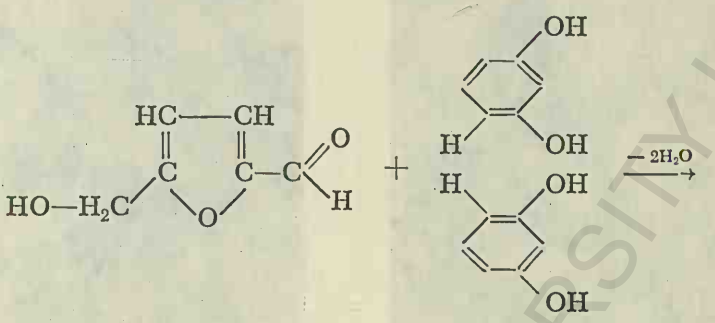


Fructoza (forma furanozică)

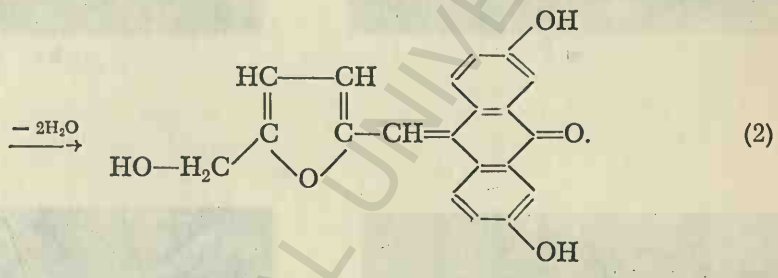
Oximetilfurfurol

$+ 3H_2O.$ (1)

După cum se vede din reacția (1), fructoza prin încălzire în mediu puternic acid pierde trei molecule de apă transformîndu-se în oximetilfurfurol. Acesta reacționează cu rezorcina formînd un compus colorat în roșu-vișiniu sau în roșu (2):



Oximetilfurfurol Rezorcină



(2)

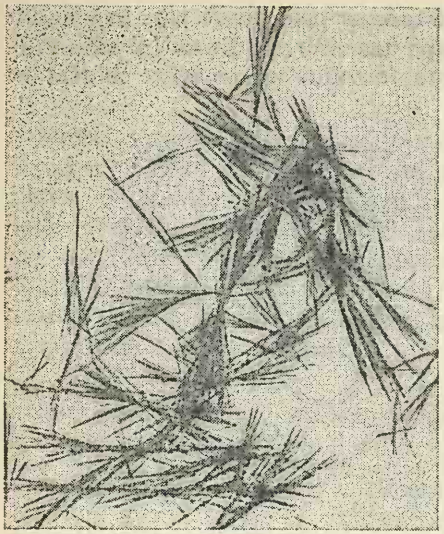
Complex roșu-vișiniu

Aldozele (glucoza, galactoza, manoza) pot forma, de asemenea, prin încălzire cu acizii minerali, oximetilfurfurol (reacția M o l i s c h), însă este necesară o încălzire mult mai îndelungată și în prezența unui acid mineral mai puternic. În condițiile experimentale ale reacției S e l i w a n o f f, transformarea aldohexozelor în oximetilfurfurol decurge mult mai încet decît în cazul cetozelor, fiind practic absentă, ceea ce asigură specificitatea reacției.

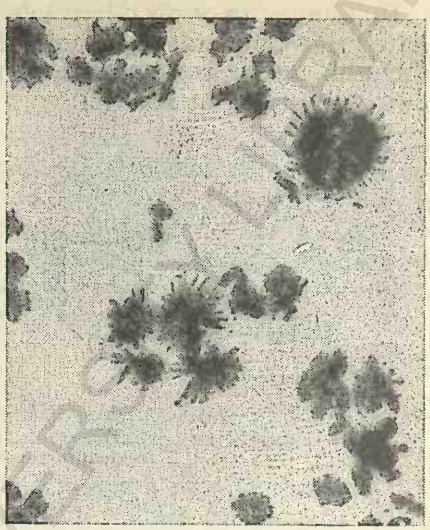
Reactivi necesari: 1) Fructoză, soluție 1%; 2) Glucoză, soluție 1%; 3) Reactiv S e l i w a n o f f. În 100 ml de soluție de HCl, 20% se dizolvă 0,05 g de rezorcină. Pentru prepararea soluției de HCl 20% se iau 45 ml de acid clorhidric concentrat (d=1,19) și se diluează într-o capsulă de porțelan pînă la un volum final de 100 ml.

Modul de lucru. În două eprubete se pun cu o pipetă 1—2 ml de soluție S e l i w a n o f f la care se adaugă, în prima eprubetă, 2—3 picături de fructoză, iar în eprubeta a doua, 2—3 picături soluție de glucoză 1%. Eprubetele se încălzesc pe o baie de apă pînă la fierbere. Se notează și se explică rezultatele reacției.

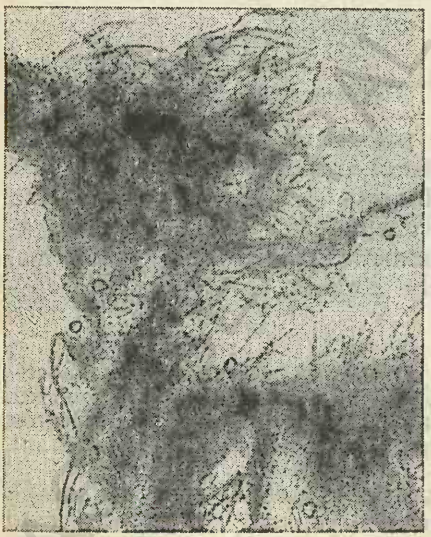
BCU CLUJ CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY



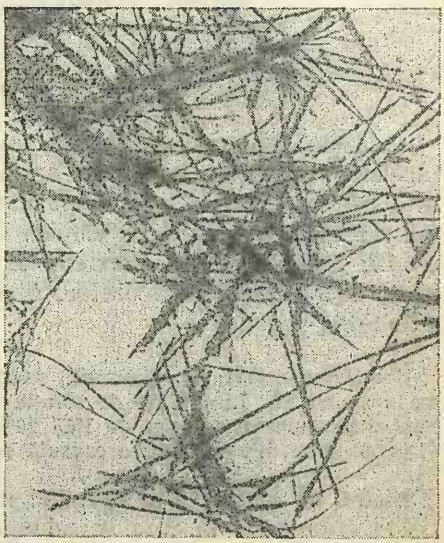
a



b



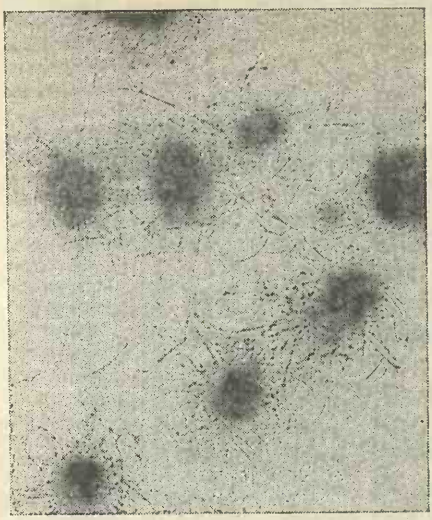
c



d

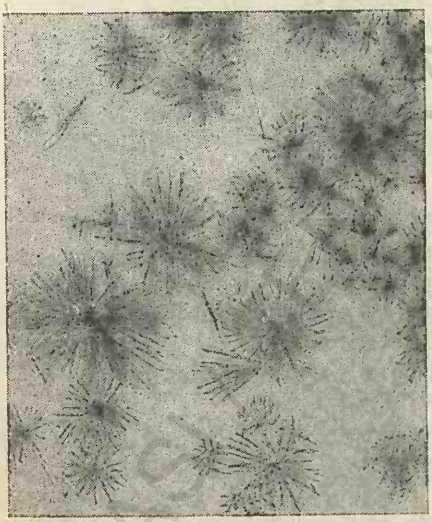
Fig. 43. Cristalele de osazonă
a — glucozasone; *b* — galactosazone; *c* — arabinosazone; *d* — xilosazone;

BCU IAȘI UNIVERSITY LIBRARY

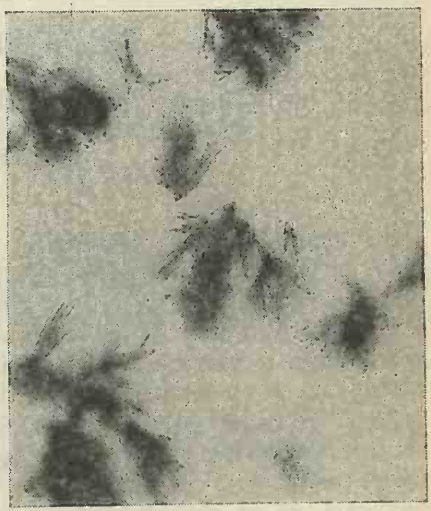


e

f



g



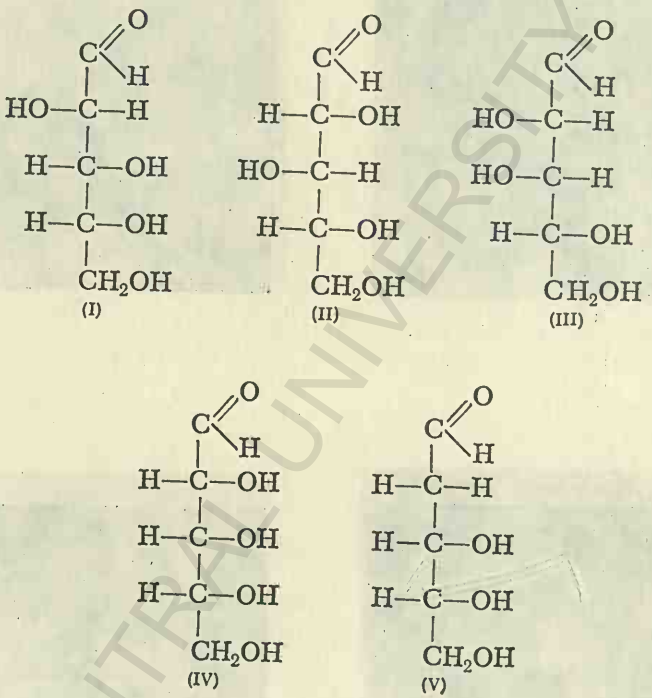
h

ale principalelor hexoze:

e — lactosazone; *f* — maltosazone; *g* — celobiosazone; *h* — sorbosazone.

3.2.1.8. Reacția pentozelor cu orcina și fluoroglucina

Pentozele sînt monozaharide cu cinci atomi de carbon. Arabinoza (I), xiloza (II), lixoza (III), riboza (IV), dezoxiriboza (V) sînt principalii reprezentanți ai acestei clase de substanțe.

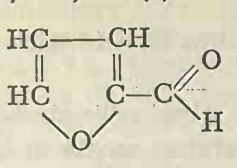


Pentozele sînt larg răspîndite în lumea vegetală. În organismele animale și vegetale, pentozele se întîlnesc în compoziția nucleotidelor, a unor coenzime (coenzima *A*, riboflavina, nicotinamidadenindinucleotida *(NAD)*, nicotinamidadenin dinucleotida fosforilată *(NADP)*, precum și în cobalamină (vitamina B_{12}). Esterii fosforici ai pentozelor au un rol important în metabolismul nucleotidelor și gliceridelor.

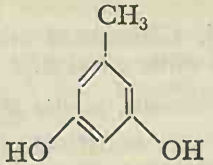
Ca și în cazul glucozei, consumul excesiv de produse alimentare care conțin însemnate cantități de pentoze provoacă eliminarea acestora în urină-pentozuria. De aceea este foarte important, mai ales în clinica medicală, să se deosebească pentozuria de glucozurie.

Principiul reacției. Pentozele, sub acțiunea acidului clorhidric concentrat și la cald, pierd trei molecule de apă, transformîndu-se în

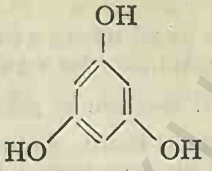
furfurol, care cu orcina colorează soluția în verde, iar cu fluoroglucina — în roșu-vișiniu (1):



Furfurol



Orcina



Fluoroglucina

Reactivi necesari: 1) Acid clorhidric concentrat; 2) Orcină, soluție preparată în soluție de HCl 25%. Într-un balon cotat de 100 ml se măsoară cu o pipetă 25 ml soluție de HCl, 25% și 5 ml soluție de $FeCl_3$, 5%, la care se adaugă ulterior 0,2 g de orcină. După dizolvarea completă a orcinei, volumul se aduce la semn cu soluția de HCl; 3) Fluoroglucină, soluție 0,2%, preparată în HCl; 4) Pentoză, soluție 0,25%.

Reacția cu orcină. Se pun cu o pipetă într-o eprubetă 2 ml de soluție de orcină și se încălzește timp de 5 minute la flacăra unui bec de gaz. Imediat se adaugă 2—5 picături soluție de pentoză, 0,25% și după 2—4 minute, conținutul eprubetei se încălzește pînă la fierbere, iar soluția se colorează în verde. Reacția este specifică pentru pentoze și metilpentoze.

Reacția cu fluoroglucină. Într-o eprubetă se pun cu pipeta 2 ml soluție de fluoroglucină, 0,2% și se încălzește pînă la fierbere. Se adaugă 0,2—0,4 ml soluție de pentoză 1% și instantaneu se observă apariția unei colorații roze, care trece imediat în roșu-vișiniu. După răcirea soluției se poate observa apariția unui precipitat colorat.

Observații. Prezența $FeCl_3$ în soluția de orcină determină o creștere considerabilă a sensibilității reacției. Soluția astfel preparată este cunoscută în literatură sub numele de *reactivul* B i a l.

Reacția de culoare a pentozelor cu orcina este folosită curent pentru dozarea colorimetrică a pentozelor în materialul biologic, iar proprietatea fluoroglucinei de a forma precipitate cu furfurolul rezultat din pentoze este utilizată pentru determinarea acestora pe cale gravimetrică.

3.2.1.9. Reacția universală Thomas

P r i n c i p i u l r e a c ț i e i. Glucidele (pentoze sau hexoze) în mediu alcalin și la cald, în prezența triptofanului, colorează soluția de analizat în mod diferit, caracteristic pentru glucidul prezent în soluție.

Reactivi necesari: 1) Triptofan, soluție 0,1%; 2) Glucoză, soluție 1%; 3) Fructoză, soluție 1%; 4) Arabinoză, soluție 0,5%; 5) Xiloză, soluție 0,5%.

Modul de lucru. Se iau într-o eprubetă 2 ml din soluția de triptofan 0,1% și se adaugă apoi 5—10 mg (0,9—1,2 ml) din glucidul ce urmează să fie analizat. Amestecul se încălzește imediat la fierbere pe o baie de apă, timp de cîteva minute.

Soluția de triptofan din eprubetă se va colora în funcție de prezența glucidelor: cu xiloza în brun; cu arabinoza în verde-pal; cu fructoza în roșu-brun; cu glucoza în violet.

3.2.2. SEPARAREA GLICOGENULUI HEPATIC ŞI PROPRIETĂŢILE LUI

Principiul metodei. Glicogenul este extras cu acid tricloracetic şi precipitat ulterior cu alcool etilic absolut.

Reactivi necesari: 1) Acid tricloracetic, soluţie 3%; 2) Alcool etilic absolut.

Modul de lucru. Animalul este sacrificat şi ficatul se scoate imediat şi se spală cu apă pentru îndepărtarea sîngelui. Vezica biliară este îndepărtată şi ficatul este tăiat în bucăţi mici cu un cuţit inoxidabil. Se mojarează cu o cantitate de 2 ori mai mare de acid tricloracetic 3%. Pentru distrugerea structurii celulare se adaugă nisip de cuarţ, spălat în prealabil cu acid clorhidric şi apă distilată. Cînd ţesutul hepatic conţine mari cantităţi de glicogen, extractul obţinut după centrifugare are o culoare alb-lăptoasă. Centrifugatul se recoltează într-un pahar Berzelius şi reziduul este din nou mojarat în prezenţa nisipului de cuarţ şi a unui volum egal de acid tricloracetic 3%. Mojaratul este centrifugat şi partea alicotă se uneşte cu extractul anterior. Se notează volumul final al extractului şi se adaugă un volum egal de alcool etilic 96%, soluţia amestecîndu-se în timpul adăugării alcoolului cu ajutorul unei baghete de sticlă. Se trece amestecul în tuburi de centrifugă cu o capacitate corespunzătoare şi precipitatul format se separă prin centrifugare. Partea alicotă este îndepărtată şi reziduul este tratat cu 2—3 volume de apă distilată, se amestecă bine cu o baghetă de sticlă şi în final se adaugă un volum egal de alcool etilic 96%. Amestecul este din nou centrifugat. Operaţia de spălare a precipitatului se repetă de 3, 4 ori, după care precipitatul este spălat de 2 ori cu alcool etilic 96%. Se usucă în exicator, sub vacuum, pe clorură de calciu proaspăt calcinată.

Glicogenul se prezintă sub forma unui praf amorf de culoare albă, uşor solubil în apă, cu care formează soluţii coloidale. Glicogenul este insolubil în alcool şi eter.

Randamentul metodei depinde de starea fiziologică a animalului sacrificat. Dacă cu 4 ore înainte de sacrificare i se injectează intraperitoneal o soluţie de glucoză 20—40%, cantitatea de glicogen hepatic creşte considerabil.

3.3. DETERMINAREA GLUCIDELOR ÎN MATERIALUL BIOLOGIC

3.3.1. DETERMINAREA AMIDONULUI. METODA PROSCURIAKOV ŞI KOJEVNICOVA

Principiul metodei. Amidonul este hidrolizat în mediu acid şi glucoza rezultată se dozează cantitativ după metoda Bertrand.

Reactivi necesari: 1) Reactivi pentru dozarea glucozei după Bertrand; 2) Hidroxid de sodiu, soluţie 0,7%; 3) Acid acetic, soluţie 5%; 4) Fenolftaleină, soluţie 1%; 5) Iod, soluţie *N*/10; 6) Acid sulfuric, soluţie 25%; 7) Alcool etilic, soluţie 60%.

Modul de lucru. Materialul vegetal uscat în care urmează să se dozeze amidonul se macerează prin mojarare. Se cîntăresc la balanța analitică eșantioane între 0,2 și 0,25 g material macerat și se trec în baloane Erlenmeyer de 50 ml, în care se măsoară cu o pipetă 20 ml soluție de KOH 0,7%. Conținutul baloanelor se încălzește pe o baie de apă la temperatura de 90°, timp de 1 oră, amestecîndu-se din cînd în cînd cu ajutorul unei baghete de sticlă.

După răcire, conținutul fiecărui balon Erlenmeyer se trece cantitativ într-un balon cotat (sau cilindru gradat) cu o capacitate de 50 ml, se aduce la semn cu apă distilată și se filtrează. Filtrul de hîrtie utilizat pentru filtrare trebuie spălat în prealabil de cîteva ori cu apă distilată fierbinte pentru îndepărtarea substanțelor reducătoare prezente în hîrtia de filtru. În acest scop se vor folosi aproximativ 20—25 ml apă distilată încălzită la fierbere.

Din filtratul limpede obținut se recoltează două probe a 10 ml de filtrat și se introduc în tuburi de centrifugă cu o capacitate de 20 ml. Probele sînt neutralizate cu soluție de acid acetic 5%, în prezența fenolftaleinei ca indicator. Se adaugă apoi soluție de iod $N/10$ (aproximativ 1—1,5 ml) pînă la apariția unei colorații brune a soluției de analizat. După 5 minute de la adăugarea iodului se adaugă cu pipeta atent, pe peretele tuburilor de centrifugă, 2—3 ml de soluție de H_2SO_4 25%, agitîndu-se în același timp conținutul.

Probele sînt centrifugate și ulterior lichidul de deasupra precipitatelor se îndepărtează prin sifonare cu ajutorul unei pipete sau al unui capilar montat la trompa de vid. Precipitatele sînt spălate de 2 ori cu cîte 10 ml soluție de alcool etilic 60% și după ultima centrifugare sînt trecute cantitativ cu ajutorul a 18 ml de apă distilată (prin două spălări repetate) din tuburile de centrifugă în baloane.

Preparatul astfel obținut este tratat cu 5 picături de soluție de Na_2SO_3 10% și 2 ml de soluție de HCl 20%. Amidonul este hidrolizat prin încălzirea probelor pe o baie de apă (la fierbere), timp de 3 ore. În final, hidrolizatul este neutralizat cu soluție de KOH 10% și glucoza rezultată se dozează după metoda Bertrand.

3.3.2. DETERMINAREA GLICOGENULUI ÎN ȚESUTURI. METODA van der KLEIJ[1]

Principiul metodei. Glicogenul este hidrolizat la cald cu formare de glucoză în prezența acidului sulfuric concentrat. Glucoza este deshidratată în mediu puternic acid cu formare de 5-oximetilfurfurol care, în prezența acidului sulfuric concentrat, colorează soluția de cercetat în roz stabil. Intensitatea colorației soluției este direct proporțională cu concentrația glucozei rezultată după degradarea glicogenului tisular.

[1] În descrierea metodei au fost incluse modificările aduse ulterior de Kemp și colaboratorii.

Reactivi necesari: 1) Glucoză, p.a., pentru prepararea soluțiilor standard; 2) Acid sulfuric, concentrat p.a., (d=1,84); 3) Sulfat de argint, soluție. Se dizolvă 5 g de acid tricloracetic și 0,1 g de Ag_2SO_4 în 100 ml de apă distilată; 4) Acid tricloracetic, preparat chimic pur.

Modul de lucru. În tuburi de centrifugă conice gradate se pun cu pipeta 0,5 ml de amestec acid tricloracetic și sulfat de argint. Ultimul reactiv este indispensabil pentru precipitarea clorurilor libere prezente în țesuturi care pot prejudicia dezvoltarea culorii în probe, influențînd negativ asupra rezultatelor.

Se cîntăresc la balanța de torsiune probe de țesut egale cu 150—200 mg în cazul țesutului hepatic și 200—250 mg pentru țesutul muscular, se mojarează în prezența nisipului de cuarț și se trec cantitativ în tuburi de centrifugă, folosindu-se în acest scop 4,5 ml (exact!) de acid tricloracetic care conține Ag_2SO_4. Cantitățile de țesut indicate mai sus sînt recomandate ca fiind corespunzătoare numai în cazul cînd se folosește țesut congelat cu ajutorul aerului sau azotului lichid, la temperaturi scăzute —170°C. Cînd recoltarea probelor se face fără o congelare prealabilă a țesutului, cantitatea de țesut recoltată pentru dozarea glicogenului scade simțitor: pentru țesutul hepatic sînt necesare aproximativ 25—45 mg, iar pentru țesutul muscular, 120—160 mg țesut proaspăt. În acest caz se recomandă a efectua operațiunile de cîntărire într-un timp foarte scurt pentru evitarea uscării țesutului la temperatura camerei de lucru.

După recoltarea și mojararea probelor în prezența nisipului de cuarț, conținutul tuburilor de centrifugă se agită energic, timp de 5 minute, se închid ermetic cu ajutorul dopurilor rodate. Probele se introduc pentru 15 minute într-o baie de apă clocotită. După răcirea tuburilor de centrifugă într-un curent de apă de robinet, volumul probelor se readuce la 5 ml cu reactivul $Ag_2SO_4+CCl_3COOH$, conținutul lor se agită energic și apoi sînt centrifugate la 4—5 000 turații/minut, timp de 20 de minute.

Prepararea probelor pentru citirea la fotocolorimetru. După centrifugare din partea alicotă a fiecărei probe se recoltează 1,5 ml de centrifugat și se trece într-o eprubetă perfect uscată (Ø=4,0 cm și h=20 cm) în care se adaugă ulterior, dintr-o biuretă, 4,5 ml de H_2SO_4 concentrat (d=1,84). Conținutul se agită atent și energic și eprubetele se introduc într-o baie de apă la 100°C timp de 6 și 1/2 minute (exact!). Se dezvoltă o colorație roză stabilă cîteva ore.

După 6 și 1/2 minute probele sînt răcite într-un curent de apă de robinet și apoi citite la fotocolorimetru la λ=520 mμ (filtrul verde) și cu cuva de 1 cm. Proba martor, cu un volum final de 6 ml, constă din 4,5 ml acid sulfuric concentrat și 1,5 ml de apă distilată și este prelucrată concomitent cu probele de cercetat.

Cînd glicogenul este prezent în probă în cantități masive, probele după încălzirea pe baia de apă la 100°C se colorează în brun, datorită carbonizării parțiale a glicogenului nehidrolizat. În acest caz se recomandă refacerea probelor după diluarea prealabilă, aproximativ de 2—3 ori, a centrifugatului cu ajutorul reactivului Ag_2SO_4 și CCl_3COOH.

Construirea curbei etalon. Cantitatea de glucoză din probe se determină cu ajutorul curbei etalon obținută prin citirea la fotocolorimetru a unei serii de soluții standard de glucoză (v. tabela 14). Pentru prepararea soluției standard (stoc), o cantitate definită de glucoză p.a. este tarată și expusă prealabil într-un termostat timp de 6—7 ore, la temperatura de 50—60°C. Fiola cu glucoză se cîntărește după 6—7 ore și preparatul este din nou expus la o temperatură de 105°C pînă la obținerea unei tare constante.

Tabela 14

Construirea curbei etalon pentru dozarea glucozei rezultate după degradarea glicogenului tisular[1]

Reactivi	Eprubeta							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Glucoză, soluție standard (ml)	0,25	0,50	0,75	1,00	1,50	2,00	2,50	0,00
Apă distilată (ml)	4,75	4,50	4,25	4,00	3,50	3,00	2,50	0,00
Soluție de glucoză diluată (ml)	1,50	1,50	1,50	1,50	1,50	1,50	1,50	1,50
Acid sulfuric, concentrat (ml)	4,50	4,50	4,50	4,50	4,50	4,50	4,50	4,50

Probele sînt încălzite timp de 6 1/2 minute pe o baie de apă fierbinte și apoi răcite într-un curent de apă de robinet.

Cantitatea de glucoză în probă (exprimată în μg)	75	150	225	300	375	450	525	martor

[1] Valorile *E* citite pentru probele etalon din tabelă la fotoelectrocolorimetrul FEK-H-57; cuva de 10 mm au fost utilizate pentru construirea curbei etalon, din figura 44.

Pentru construirea curbei etalon se prepară o soluție standard (stoc) de glucoză 0,1%, dizolvîndu-se în acest scop 100 mg (exact!) de glucoză p.a. în 100 ml de apă distilată. Din această soluție se iau probe care conțin cantități diferite de glucoză și al căror volum variază între 0,25 și 2,50 ml, se diluează cu apă distilată pînă la un volum total egal cu 5 ml. Din soluțiile astfel obținute se recoltează pentru citirea la fotocolorimetru 1,5 ml, la care se adaugă cu pipeta 4,5 ml de H_2SO_4 concentrat și probele se introduc într-o baie de apă în clocot timp de 6 și 1/2 minute (exact!), se răcesc și se citesc la fotoclorimetru în primele 45 de minute.

Rezultatele obținute după citirea probelor etalon la fotocolorimetru sînt utilizate pentru construirea curbei etalon, valorile *E* fiind înscrise pe ordonată, iar concentrația glucozei în probe, exprimată în μg, pe abscisă (fig. 44).

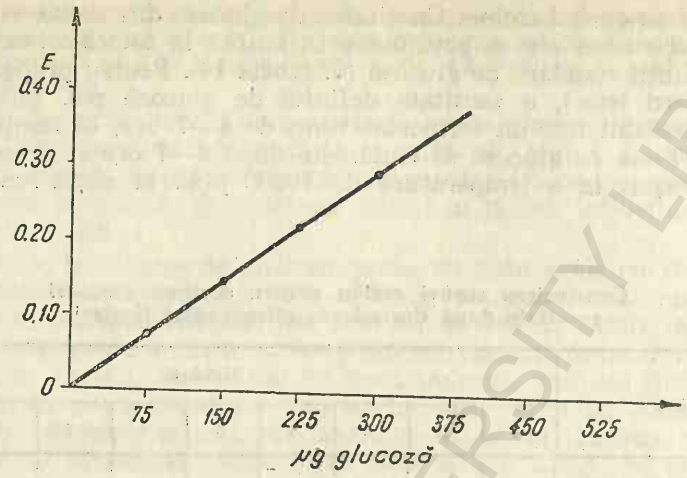


Fig. 44. Curba etalon pentru dozarea glucozei rezultată după hidroliza acidă a glicogenului.

Calcularea cantității de glucoză în probe. Folosindu-se valoarea E citită pentru proba de cercetat se găsește pe curba etalon cantitatea de glucoză în probă, exprimată în μg. Cantitatea de glucoză în probă se calculează cu ajutorul formulei (1):

$$G_t = \frac{100 \times c \times V}{g \times 1{,}5 \times 100}, \qquad (1)$$

unde:

G_t este cantitatea totală de glucide, exprimată în mg% de glucoză;
c — concentrația glucozei, în g, citită pe curba etalon;
V — volumul în ml, al amestecului; și —
g — greutatea probei inițiale, exprimată în g.

Calcularea cantității de glicogen în țesut. Pentru calcularea conținutului de glicogen în țesut este necesar să se cunoască concentrația glucozei în țesutul respectiv. În acest scop se dozează glucoza din țesut după metoda Hagedorn-Jensen în extractele tisulare obținute după Roe și Rice și din valoarea G_t (formula 1) se scade valoarea obținută pentru glucoza tisulară (gt_1).

Fie G_t cantitatea glucidelor totale din țesut (glucoza tisulară plus glucoza rezultată din hidroliza glicogenului), exprimată în mg% de glucoză, și gt_1 — cantitatea de glucoză tisulară (mg%); x — cantitatea de glicogen în țesutul studiat (în mg%) va fi egală cu:

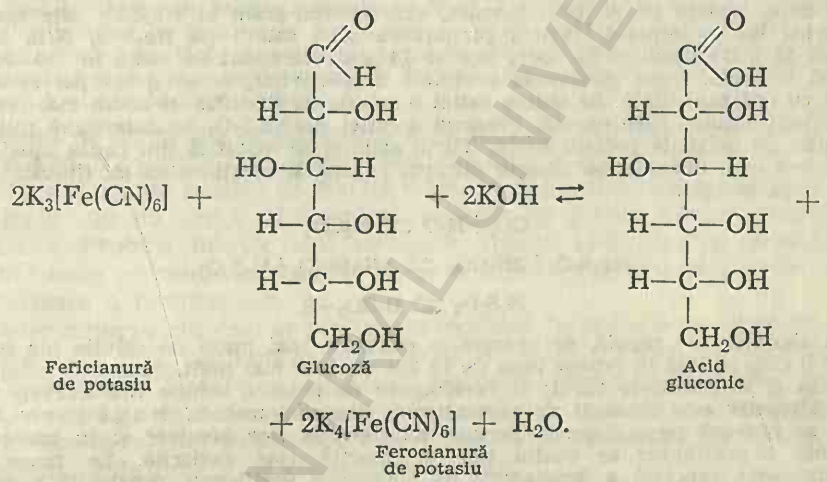
$$x = (G_t - gt_1) \times 0{,}927, \qquad (2)$$

unde 0,927 reprezintă coeficientul de transformare a glucozei în glicogen sau cantitatea de glicogen, exprimată în mg%, care corespunde 1 mg% de glucoză.

Metoda de dozare a glicogenului tisular este deosebit de valoroasă pentru explorarea diferitelor stări funcționale ale organismului animal, precum și pentru studiul influenței diferiților factori asupra metabolismului glucidelor.

3.3.3. DETERMINAREA GLUCOZEI ÎN SÎNGE. METODA HAGEDORN-JENSEN

Principiul metodei. Proteinele sînt precipitate în mediu alcalin și la cald și separate prin filtrare. În filtratul obținut se dozează glucoza. Fericianura de potasiu în prezența glucozei și în mediu alcalin este redusă la ferocianură de potasiu. Cantitatea de $K_3[Fe(CN)_6]$ este direct proporțională cu cantitatea de glucoză prezentă în soluție (1):



(1)

Deoarece reacția de reducere a fericianurii la ferocianură este reversibilă, este necesară îndepărtarea $K_4[Fe(CN)_6]$ formată. În acest scop se folosește soluția de sulfat de zinc, care reacționează cu ferocianura de potasiu, formînd un complex insolubil (2):

$$2K_4[Fe(CN)_6]+3ZnSO_4=K_2Zn_3[Fe(CN)_6]_2+3K_2SO_4. \quad (2)$$

Fericianura de potasiu în exces (care nu a fost redusă de glucoză) reacționează în mediu acid cu iodura de potasiu preparată în soluție de sulfat de zinc și clorură de sodiu (3):

$$2K_3[Fe(CN)_6]+2KI=2K_4[Fe(CN)_6]+I_2. \quad (3)$$

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Ferocianura rezultată este din nou precipitată sub formă de complex $K_2Zn_3[Fe(CN)_6]_2$ *(reacţia 2), iar iodul eliberat este titrat cu tiosulfat de sodiu (4):*

$$2Na_2S_2O_3 + I_2 = Na_2S_4O_6 + 2NaI. \quad (4)$$

Tiosulfat de sodiu — Tetrationat de sodiu — Iodură de sodiu

Cînd concentraţia glucozei în sînge este mare, cantitatea de ferocianură în exces (reacţia 1) este minimă şi în consecinţă se va elibera şi o cantitate redusă de iod (reacţia 3), volumul de tiosulfat de sodiu utilizat pentru titrarea acestuia fiind de asemenea mic. Prin urmare, dacă între cantitatea de glucoză din probă şi fericianura redusă există un raport direct proporţional, volumul tiosulfatului de sodiu utilizat pentru titrarea iodului rezultat (reacţia 3) este invers proporţional cu concentraţia glucozei.

Reactivi necesari: 1) Hidroxid de potasiu, soluţie *N*/10; 2) Sulfat de zinc, soluţie 0,45%. Se prepară pentru fiecare determinare prin diluarea unei soluţii-stoc de sulfat de zinc 45%; 3) Tiosulfat de sodiu, soluţie *N*/200. Se prepară în momentul utilizării prin diluarea unei soluţii de tiosulfat de sodiu *N*/10. Tiosulfatul de sodiu reacţionează cu iodul după reacţia (4) şi, prin urmare, echivalentul-gram al $Na_2S_2O_3$ este egal cu greutatea lui moleculară. Pentru prepararea unei soluţii de $Na_2S_2O_3$ *N*/10 se va dizolva 25 g de tiosulfat de sodiu pur şi 0,1 g de carbonat de sodiu în 750—800 ml de apă distilată. După dizolvarea completă a reactivilor, volumul soluţiei se aduce la 1 l cu apă bidistilată. Se obţine astfel o soluţie de tiosulfat de sodiu mai concentrată decît soluţia *N*/10 exactă. Factorul soluţiei de $Na_2S_2O_3$ se determină utilizînd o soluţie de iodat de potasiu *N*/200. Titrul soluţiei se modifică din cauza bioxidului de carbon care eventual se găseşte dizolvat în apă şi reacţionează cu tiosulfatul de sodiu după reacţia:

$$CO_2 + H_2O \rightleftarrows H_2CO_3 \quad (1)$$

$$Na_2S_2O_3 + 2H_2CO_3 \rightleftarrows 2NaHCO_3 + H_2S_2O_3 \quad (2)$$

$$H_2S_2O_3 \rightleftarrows H_2SO_3 + S. \quad (3)$$

În laborator, de regulă, se prepară o cantitate mai mare de soluţie (de exemplu, 5 l) care se lasă în repaus timp de 10 zile şi chiar mai mult, după care soluţia se filtrează şi se stabileşte titrul; 4) Fericianură de potasiu, soluţie *N*/200. Prepararea acestui reactiv este deosebit de pretenţioasă, deoarece metoda Hagedorn-Jensen se bazează pe reducerea fierului trivalent la fier bivalent şi în consecinţă prezenţa impurităţilor ce conţin fier în reactiv este nedorită. Se recomandă recristalizarea repetată a fericianurii de potasiu şi verificarea prealabilă a reactivului.

Pentru purificarea reactivului prin recristalizări repetate se iau aproximativ 130 g de $K_3[Fe(CN)_6]$ şi se dizolvă în 350 ml de apă distilată prin încălzire la 70°C. Soluţia obţinută este filtrată şi răcită, agitîndu-se energic în timpul cristalizării, cu ajutorul unei baghete de sticlă, partea centrală a lichidului. Se obţin cristale de dimensiuni foarte mici, care sînt separate, uscate la temperatura camerei şi păstrate în flacoane de culoare brună, bine închise. Randamentul este de aproximativ 38—40%.

Pentru verificarea fericianurii obţinute se fac următoarele reacţii:

— Reacţia pentru identificarea sărurilor fierului trivalent: se adaugă la 5 ml de soluţie de $K_3[Fe(CN)_6]$ 5% 1—2 picături de soluţie de H_2SO_4 10% şi 2 picături de soluţie de $K_4[Fe(CN)_6]$ 1%. În prezenţa fierului trivalent, soluţia se colorează în albastru.

— Reacţia pentru identificarea ferocianurii: se pun cu o pipetă la 5 ml soluţie de $K_3[Fe(CN)_6]$ 5% 2—3 picături de soluţie de $FeCl_3$ 5% şi 1—2 picături de soluţie de HCl 10%. Soluţia se colorează în albastru numai în prezenţa ferocianurii.

Dacă ambele reacții sînt negative, preparatul poate fi utilizat pentru dozarea glucozei.

Pentru prepararea unei soluții de fericianură de potasiu *N*/200, se cîntăresc la balanța analitică 1,65 g de fericianură, 10,60 g de carbonat de sodiu anhidru și după dizolvarea reactivilor, soluția se aduce la 1 l cu apă bidistilată. Prepararea soluției se face cu 2—3 zile înainte de utilizare, deoarece $K_3[Fe(CN)_6]$ se degradează cu timpul și îndeosebi la lumină, din care cauză se recomandă păstrarea reactivului în sticle brune și reînnoirea lui la minimum 30 de zile după preparare. 5) Soluția de iodură de potasiu, sulfat de zinc și clorură de sodiu. Se prepară în soluție de $ZnSO_4$ și NaCl după cum urmează: 50 g de $ZnSO_4$ p.a. și 250 g de NaCl se dizolvă într-un litru de apă bidistilată și se filtrează. În momentul utilizării soluției de iodură de potasiu se cîntăresc 2,5 g de KI, se trec într-un cilindru gradat și se dizolvă în amestec de $ZnSO_4$+NaCl, volumul final aducîndu-se la 100 ml cu aceeași soluție. Prepararea din timp a KI este inutilă, deoarece după cîteva ore iodul se degajă; 6) Iodat de potasiu, soluție *N*/10. Se cîntăresc la balanța analitică 3,567 g de KIO_3 chimic pur (uscat în prealabil în termostat la 100°C) și se dizolvă într-un litru de apă bidistilată. În momentul folosirii iodatului de potasiu se prepară prin diluarea soluției *N*/10 o soluție *N*/200; 7) Acid acetic, soluție 3%. Se pun cu o pipetă 3 ml de acid acetic glacial într-un balon cotat de 100 ml și se aduce la semn cu apă bidistilată. Acidul acetic concentrat nu trebuie să conțină urme de fier; 8) Amidon, soluție 1%, preparată în soluție saturată de NaCl. Se dizolvă prin încălzire, în 100 ml de soluție saturată de NaCl, 1 g de amidon solubil. (Pentru conservarea soluției de amidon se recomandă pe lîngă Na Cl și HgI_2 camforul, naftalina etc. Utilizarea HgI_2 este însă în cazul de față contraindicată, datorită faptului că reactivul conservant conține iod). 9) Rondele din hîrtie de filtru spălate de mai multe ori cu apă distilată fierbinte.

Modul de lucru. Se pregătește o serie de eprubete curate și numerotate și se pun cu pipeta în fiecare eprubetă cîte 5 ml de soluție de $ZnSO_4$, 0,45% și 1 ml de soluție de NaOH 0,1*N*. În două eprubete, notate cu cifre distincte sau cu litera *M* (martor), se pun cu pipeta aceiași reactivi ca mai sus. Probele martor sînt necesare pentru identificarea substanțelor reducătoare prezente în reactivi și, prin urmare, pentru corectarea corespunzătoare a rezultatelor.

Determinarea glucozei se realizează exclusiv în probele de sînge proaspăt recoltat. Ca anticoagulant se recomandă folosirea fluorurii de sodiu (2 mg de NaF pentru fiecare ml de sînge recoltat). Fluorura de sodiu prezintă unele avantaje față de alți agenți anticoagulanți (heparina, oxalații etc.). Ea precipită calciul, inhibă secreția leucocitară, blochează glicoliza și concomitent preîntîmpină și coagularea sîngelui.

Se recoltează din sîngele proaspăt, cu o micropipetă, cel puțin două eșantioane a 0,1 ml de sînge. Vîrful micropipetei se șterge atent cu o bucată de vată curată și se tamponează ușor pînă cînd nivelul sîngelui ajunge în micropipetă la diviziunea corespunzătoare de 0,1 ml. Conținutul micropipetei se trece în eprubeta cu NaOH și $ZnSO_4$ și micropipeta se spală de cîteva ori cu soluția din eprubetă pînă cînd pereții micropipetei nu mai prezintă urme de sînge. În probele martor se adaugă cu pipeta o cantitate corespunzătoare (0,1 ml) de apă bidistilată. În continuare, probele martor sînt prelucrate identic cu probele care conțin eșantioane de sînge.

Cu ajutorul unui stativ metalic, eprubetele din prima serie se introduc pentru 3 minute (exact!) într-o baie de apă în clocot (fig. 45). Proteinele sînt precipitate sub forma unor particule albe, uneori de culoare cenușie, care sedimentează relativ repede.

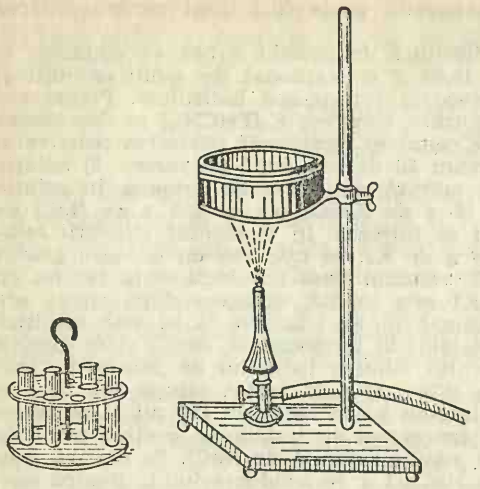


Fig. 45. Baie de apă și stativ metalic pentru eprubete (după Hagedorn-Jensen).

Se pregătește o nouă serie de eprubete (20×100 mm) sau de pahare Hagedorn, numerotate la fel cu eprubetele din prima serie și prevăzută cu pîlnii și rondele de filtru spălate cu apă distilată clocotindă. După 3 minute, conținutul eprubetelor se filtrează în paharele Hagedorn, respectîndu-se numerele de ordine de pe ambele serii de eprubete. Filtrul și eprubetele din prima serie sînt spălate de 2 ori cu cîte 3 ml de apă bidistilată fierbinte și apele de spălare sînt filtrate și colectate în paharele Hagedorn.

Conținutul paharelor Hagedorn se răcește pe o baie de apă, sau într-un curent de apă de robinet, și în fiecare eprubetă se măsoară cu pipeta exact (!) 2 ml de soluție de fericianură de potasiu *N*/200 (soluția 4) și probele se încălzesc din nou timp de 15 minute pe o baie de apă, la 100°C. Dacă conținutul paharelor Hagedorn se decolorează complet după fierbere, ceea ce dovedește că întreaga cantitate de fericianură de potasiu a fost redusă la ferocianură de potasiu de glucoza prezentă în probă, se recomandă refacerea probelor cu o cantitate mai mică de sînge. În general, este contraindicată adăugarea la probe după fierberea acestora a unei noi cantități de fericianură deoarece, pe lîngă erorile inevitabile, calculul rezultatelor devine laborios.

După 15 minute, eprubetele sînt răcite și în fiecare se pun cu pipeta cîte 3 ml de soluție $ZnSO_4$ și NaCl preparată cu KI (v. soluția 5), 2 ml de soluție de acid acetic, 3% și 2—3 picături din soluția de amidon, 1%. Conținutul eprubetelor, după adăugarea acestor reactivi, se colorează în albastru. Probele sînt titrate (pe un fond alb) cu soluție de tiosulfat de sodiu *N*/200 pînă la decolorarea completă.

Determinarea titrului soluției de tiosulfat de sodiu. Într-un balon Erlenmeyer se iau 2 ml de iodat de potasiu, soluție N/200, 2 ml de soluție de acid acetic, 3%, 3 ml de amestec $ZnSO_4$+NaCl+KI și 2—3

picături de soluție de amidon, 1%. Amestecul se titrează cu soluție de tiosulfat de sodiu *N*/200 pînă la completa decolorare.

Determinarea titrului soluției de fericianură de potasiu. Într-un balon Erlenmeyer se pun cu pipeta 2 ml de soluție de $K_3[Fe(CN)_6]$ *N*/200, 3 ml de soluție $ZnSO_4$+NaCl+KI (proaspăt preparată), 2 ml de soluție de acid acetic 3% și 2—3 picături de amidon 1%. Se titrează cu soluție de $Na_2S_2O_3$ *N*/200.

Se calculează factorul (*f*) celor două soluții, de tiosulfat de sodiu și de fericianură de potasiu, se face corectarea probelor titrate, ținînd seamă de factorul soluțiilor, iar rezultatele analizei se citesc în tabela Hagedorn-Jensen (tabela 15).

Tabela 15

Tabela Hagedorn-Jensen pentru calcularea cantității de zaharuri reducătoare prezente în 0,1 ml de sînge

Tiosulfat de potasiu soluție *N*/200 (ml)	0,00	0,01	0,02	0,03	0,04	0,05	0,06	0,07	0,08	0,09
0,0	0,385	0,382	0,379	0,376	0,373	0,370	0,367	0,368	0,361	0,358
0,1	0,355	0,352	0,350	0,348	0,345	0,343	0,341	0,338	0,336	0,333
0,2	0,331	0,329	0,327	0,325	0,323	0,321	0,318	0,316	0,314	0,312
0,3	0,310	0,308	0,306	0,304	0,302	0,300	0,298	0,296	0,294	0,292
0,4	0,290	0,228	0,286	0,284	0,282	0,280	0,728	0,276	0,274	0,272
0,5	0,270	0,268	0,266	0,264	0,262	0,260	0,259	0,257	0,255	0,253
0,6	2,251	0,249	0,247	0,245	0,243	0,241	0,240	0,238	0,236	0,234
0,7	0,232	0,230	0,228	0,226	0,224	0,222	0,221	0,219	0,217	0,215
0,8	0,213	0,211	0,209	0,208	0,206	0,204	0,202	0,200	0,199	0,197
0,9	0,195	0,193	0,191	0,190	0,188	0,186	0,184	0,182	0,181	0,179
1,0	0,177	0,175	0,173	0,172	0,170	0,168	0,166	0,164	0,163	0,161
1,1	0,159	0,157	0,155	0,154	0,152	0,150	0,148	0,146	0,145	0,143
1,2	0,141	0,139	0,138	0,136	0,134	0,132	0,131	0,129	0,127	0,125
1,3	0,124	0,122	0,120	0,119	0,117	0,115	0,113	0,111	0,110	0,108
1,4	0,106	0,104	0,102	0,101	0,099	0,097	0,095	0,093	0,092	0,090
1,5	0,088	0,086	0,084	0,083	0,081	0,079	0,077	0,075	0,074	0,072
1,6	0,070	0,068	0,066	0,065	0,063	0,061	0,059	0,057	0,056	0,054
1,7	0,052	0,050	0,048	0,047	0,045	0,043	0,041	0,039	0,038	0,036
1,8	0,034	0,032	0,031	0,029	0,027	0,025	0,024	0,022	0,020	0,019
1,9	0,017	0,015	0,014	0,012	0,010	0,008	0,007	0,005	0,003	0,002

Citirea rezultatelor în tabelul Hagedorn-Jensen. În prima coloană din stînga tabelei Hagedorn-Jensen se caută cifra care corespunde numărului de mililitri de tiosulfat de sodiu *N*/200 folosiți pentru titrarea probei, citindu-se întregul și prima zecimală. Cea de-a doua zecimală se caută în prima coloană orizontală delimitată de chenar. Cifra citită în tabela Hagedorn-Jensen la intersecția celor două drepte corespunde cantității de zahăr reducător din proba de analizat (0,1 ml sînge). Dacă se citesc numai cifrele care urmează după virgulă, se calculează direct

cantitatea de glucoză prezentă în 100 ml de sînge, exprimată în mg%. Din valorile citite pentru probele cu sînge se scad valorile citite pentru probele martor (media valorilor) și astfel se obține cantitatea de glucoză din sînge, exprimată în mg%.

Exemplu de calcul. Pentru titrarea probei cu sînge s-au consumat 1,36 ml de soluție de $Na_2S_2O_3$ *N*/200, iar pentru titrarea probei de control (martor) — 1,85 ml. Factorul soluției de $Na_2S_2O_3$ *N*/200 este 1,04, cei 2 ml de soluție de iodat de potasiu *N*/200 fiind titrați cu 1,92 ml de soluție de tiosulfat de sodiu *N*/200:

$$1{,}36 \times 1{,}04 = 1{,}41 \text{ ml } Na_2S_2O_3 \text{ } N/200 \text{ (proba cu sînge).}$$

$$1{,}85 \times 1{,}04 = 1{,}92 \text{ ml } Na_2S_2O_3 \text{ } N/200 \text{ (proba martor).}$$

În tabela Hagedorn-Jensen se găsește că pentru 1,41 ml de soluție de tiosulfat de sodiu *N*/200 corespund 0,104 mg de glucoză și pentru 1,92 ml $Na_2S_2O_3$, respectiv, 0,014 mg glucoză. Cantitatea de glucoză, exprimată în mg, prezentă în proba cu 0,1 ml sînge, va fi egală cu:

$$0{,}104 - 0{,}014 = 0{,}096 \text{ mg.}$$

Această cantitate — 0,096 mg de glucoză — este prezentă însă în 0,1 ml de sînge recoltat pentru dozare. Pentru a exprima rezultatul în mg%, această valoare se înmulțește cu 10(0,1×10=1 ml de sînge) și cu 100(1 ml×100 ml de sînge). Concentrația glucozei în sînge, exprimată în mg%, va fi deci egală cu 96 mg%.

În sîngele pacienților normali, cantitatea de glucoză determinată înainte de ingerarea alimentelor variază între 80 și 120 mg%. Aceste valori nu reprezintă însă efectiv numai glucoza, deoarece fericianura de potasiu reacționează și cu alte substanțe reducătoare, prezente în mod normal în sînge, de exemplu, acidul uric, creatinina, glutationul etc. În consecință, această metodă poate fi numită mai corect metoda de determinare a substanțelor „reducătoare" din sînge.

Utilizarea curentă a acestei metode în clinica medicală și, în general, în practica biochimică, se bazează însă pe două considerente principale: metoda este rapidă și exactă, în cazul cînd se respectă întocmai indicațiile speciale menționate mai sus și permite efectuarea de dozări în serie; concentrația substanțelor reducătoare prezente în sînge, cu excepția glucozei, este relativ constantă, metoda permițînd evalurea justă a fluctuațiilor survenite exclusiv în concentrația glucozei sanguine.

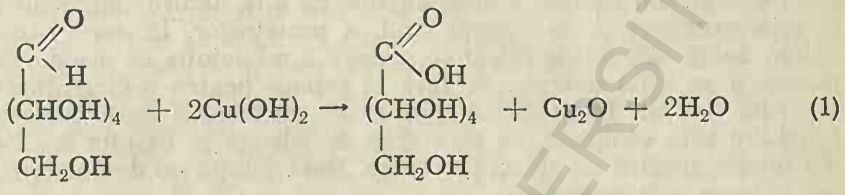
Determinarea cantitativă a glucozei din sînge are o importanță deosebită, furnizînd un material valoros pentru aprecierea dereglărilor care survin în metabolismul glucidelor (de exemplu, în diabetul zaharat). Obținerea unor rezultate corecte reclamă folosirea unei sticlării perfect curate (eprubete, pipete, microbiurete, micropipete, pîlnii etc.) și a rondelelor de filtru spălate. Pentru evitarea eventualelor erori experimentale este necesar ca înainte de fiecare determinare să se verifice titrul soluțiilor de tiosulfat de sodiu și fericianură de potasiu.

Metoda Hagedorn-Jensen poate fi utilizată și pentru dozarea zaharurilor reducătoare în materialul vegetal, însă se recomandă multă grijă în obținerea extractelor țesuturilor vegetale.

3.3.4. DETERMINAREA GLUCIDELOR REDUCĂTOARE

3.3.4.1. Metoda G. Bertrand

Principiul metodei. Hidroxidul cupric prezent în licoarea Fehling este redus de glucoză la oxid cupros, cu formarea unui precipitat roşu-cărămiziu. Oxidul cupros în prezenţa H_2SO_4 reduce sulfatul feric $Fe_2(SO_4)_3$ la sulfat feros (reacţiile 1—2):



$$\text{(CHOH)}_4 + 2\text{Cu(OH)}_2 \rightarrow \text{(CHOH)}_4 + \text{Cu}_2\text{O} + 2\text{H}_2\text{O} \qquad (1)$$

$$\text{Cu}_2\text{O} + \text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 + \text{H}_2\text{SO}_4 = 2\text{CuSO}_4 + 2\text{FeSO}_4 + \text{H}_2\text{O}. \qquad (2)$$

După cum se vede din reacţia (2), **fierul trivalent din sulfatul feric este redus la fier bivalent sub formă de sulfat feros, cantitatea ultimului fiind echivalentă cantităţii de Cu_2O oxidat. Sulfatul feros este ulterior oxidat în mediu acid de către permanganatul de potasiu.** Reacţia este complexă şi are loc în mai multe etape (3—6):

$$2\text{KMnO}_4 = \text{K}_2\text{O} + 2\text{MnO} + 5\text{O} \qquad (3)$$

$$\text{K}_2\text{O} + \text{H}_2\text{SO}_4 = \text{K}_2\text{SO}_4 + \text{H}_2\text{O} \qquad (4)$$

$$2\text{MnO} + 2\text{H}_2\text{SO}_4 = 2\text{MnSO}_4 + 2\text{H}_2\text{O} \qquad (5)$$

$$10\text{FeSO}_4 + 5\text{O} + 5\text{H}_2\text{SO}_4 = 5\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 + 5\text{H}_2\text{O}. \qquad (6)$$

Bilanţul reacţiilor (3—6) poate fi exprimat într-o singură ecuaţie sumară (7):

$$2\text{KMnO}_4 + 10\text{FeSO}_4 + 8\text{H}_2\text{SO}_4 = \text{K}_2\text{SO}_4 + 2\text{MnSO}_4 + 5\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 + 8\text{H}_2\text{O}. \qquad (7)$$

Reactivi necesari: 1) Soluţie Fehling I; 2) Soluţie Fehling II; 3) Sulfat feric, soluţie. Se dizolvă 50 g de sulfat feric $Fe_2(SO_4)_3$ în 250—300 ml de apă distilată şi 108 ml de acid sulfuric concentrat, se amestecă cu grijă pînă la dizolvarea completă a reactivului şi se aduce la 1 l cu apă distilată. Soluţia nu trebuie să aibă proprietăţi reducătoare şi de aceea în momentul pregătirii se adaugă $KMnO_4$ pînă la apariţia unei colorauii roz-pal persistente; 4) Permanganat de potasiu, soluţie 5‰. Se prepară în apă bidistilată fiartă şi răcită. Fiecare mililitru de soluţie $KMnO_4$ 5‰ (exact!) corespunde la 1 mg de cupru (reacţiile 2 şi 7); 5) Acetat de plumb, soluţie alcalină. Într-un mojar se amestecă 60 g de acetat de plumb cu 20 g de PbO. După mojarare, amestecul se trece într-o capsulă de porţelan şi se încălzeşte pe o sită de azbest pînă la apariţia unei colorauii albe-roză. Amestecul obţinut se dizolvă în 200 ml de apă distilată şi după răcire se trec într-un balon cotat 250 ml şi se aduce la semn cu apă distilată. După 10—12 ore, soluţia se filtrează şi se conservă în flacoane de culoare brună; 6) Sulfat de sodiu, soluţie saturată.

Modul de lucru

Pregătirea extractului vegetal și defecarea lui. Se cîntăresc la o balanță de precizie 15—25 g din materialul vegetal macerat și se introduce într-un balon Erlenmeyer, cu o capacitate de 250—300 ml. Se adaugă aproximativ 100—150 ml de apă distilată și proba se încălzește pe o baie de apă, la 85—90°C, timp de 30—45 de minute și apoi se răcește. Extractul se filtrează într-un balon cotat de 250 ml și se aduce la semn cu apă distilată.

Pentru determinarea cantitativă a glucidelor reducătoare este necesară îndepărtarea din extract a substanțelor de altă natură (pigmenți vegetali și acizi organici) și, în primul rînd, a proteinelor. În acest scop, la un volum de 20—25 ml de filtrat se adaugă 2 ml soluție de acetat alcalin de plumb și se agită energic. Se lasă în repaus pentru sedimentarea precipitatului format. După 5—10 minute se controlează dacă defecarea materialului este completă, în care scop se adaugă la extract 2—3 picături din soluția alcalină de acetat de plumb. Dacă soluția nu devine opalescentă, precipitarea este completă.

Excesul de acetat de plumb utilizat pentru defecare și prezent în soluție este eliminat prin adăugarea a 10—12 ml de Na_2SO_4 soluție saturată și amestecul se lasă în repaus timp de 1 și 1/2—2 ore, după care volumul balonului se aduce la semn (25 ml) cu apă distilată. Conținutul balonului se filtrează și extractul defecat se utilizează pentru dozarea glucidelor reducătoare. Într-un balon Erlenmeyer de 100—150 ml se adaugă cu o pipetă 20 ml soluție de cercetat care conține glucoză, extract vegetal, sînge deproteinizat, hidrolizat al amidonului. Cantitatea de glucoză în volumul extractului recoltat pentru analiză nu trebuie să depășească 100 mg. În soluție se adaugă 40 ml de licoare Fehling (20 ml de Fehling I+20 ml de Fehling II) și conținutul balonului se încălzește 3 minute pe o baie de apă fierbinte. După fierbere, soluția trebuie să prezinte o culoare albastră, datorită excesului de $CuSO_4$. În caz contrar, determinarea se repetă diluîndu-se soluția inițială a glucidului reducător (extractul vegetal) și folosindu-se din soluția diluată tot 20 ml. După fierberea eșantioanelor apare un precipitat roșu-cărămiziu de Cu_2O. Balonul se lasă în repaus pînă la precipitarea totală a oxidului cupros format.

Se unește vasul Bunsen, la care s-a montat filtrul, la trompa de vid și se trece foarte prudent lichidul din balonul în care s-a efectuat fierberea pe filtrul de hîrtie cu ajutorul unei baghete de sticlă, evitîndu-se însă trecerea concomitentă și a precipitatului de Cu_2O.

Precipitatul de oxid cupros din balonul Erlenmeyer se spală de 2—4 ori cu un jet de apă bidistilată fierbinte (20—40 ml). Apele de spălare, de asemenea, se trec pe filtru, lăsîndu-se deasupra precipitatului un strat subțire de lichid. Spălarea precipitatului roșu-cărămiziu de oxid cupros continuă pînă cînd reacția apelor de spălare este neutră față de hîrtia de turnesol. Tot cu un jet de apă se spală și pereții balonului, filtrul și vasul Bunsen.

Se scoate filtrul și se montează un alt balon Bunsen, bine spălat în prealabil cu apă bidistilată fierbinte. În balonul Erlenmeyer se pun cu pipeta peste precipitatul de oxid cupros 5—10 ml de soluție de $Fe_2(SO_4)_3$ pînă la dizolvarea completă a precipitatului roșu-cărămiziu, spălîndu-se concomitent, tot cu aceeași soluție, și pereții balonului. Soluția rezultată este în întregime trecută prin filtru. Balonul este spălat din nou cu 5—10 ml soluție de sulfat feric.

Lichidul de deasupra filtrului (oxidul cupros dizolvat în sulfat feric) se agită ușor în timpul filtrării cu o baghetă de sticlă, pînă la dizolvarea completă a Cu_2O, evitîndu-se însă degradarea filtrului. Se conectează balonul Bunsen la trompa de vid și se filtrează lichidul creîndu-se un vid moderat (!). Filtrul se spală cu apă bidistilată, rece, proaspăt fiartă, pînă la dispariția în apele de spălare a reacției acide față de hîrtia de turnesol.

După îndepărtarea filtrului, lichidul din balonul Bunsen se titrează cu soluție de $KMnO_4$ 5‰. Virajul coloratiei soluției de la verde la roz-pal este perfect vizibil. Cunoscîndu-se cantitatea de $KMnO_4$, folosită pentru titrare, exprimată în ml, se calculează cantitatea de cupru în mg, iar în tabela 16 se caută valoarea corespunzătoare conținutului zaharurilor reducătoare în proba de cercetat.

Stabilirea titrului de $KMnO_4$, soluție 5‰. Pentru stabilirea titrului soluției de $KMnO_4$ se utilizează oxalatul de amoniu $(NH_4)_2C_2O_4 \cdot H_2O$ (greutatea moleculară 142,12). Se cîntăresc la balanța analitică aproximativ 0,200—0,250 g de oxalat de amoniu care se dizolvă în 50—100 ml apă distilată. Ulterior se adaugă 1—2 ml de H_2SO_4 concentrat. Amestecul se încălzește la 60—80°C și se titrează cu $KMnO_4$, soluție 5‰, pînă la apariția unei coloratii roz pal care persistă timp de 1 minut (reacțiile 8—12):

$$2KMnO_4 \rightarrow K_2O + 2MnO + 5O \qquad (8)$$

$$K_2O + H_2SO_4 \rightarrow K_2SO_4 + H_2O \qquad (9)$$

$$2MnO + 2H_2SO_4 \rightarrow 2MnSO_4 + 2H_2O \qquad (10)$$

$$5 \begin{vmatrix} COONH_4 \\ | \\ COONH_4 \end{vmatrix} + 5O \rightarrow 10CO_2 + 5H_2O + 10NH_3. \qquad (11)$$

Bilanțul reacțiilor (8—11) poate fi exprimat sumar în ecuația (12):

$$2KMnO_4 + 5(NH_4)_2C_2O_4 + 3H_2SO_4 =$$

$$= K_2SO_4 + 10CO_2 + 8H_2O + 2MnSO_4 + 10NH_3. \qquad (12)$$

Compararea reacțiilor (2), (7) și (12) evidențiază faptul că o moleculă de oxalat de amoniu este echivalentă cu doi atomi de Fe, deci cu doi atomi de Cu. La doi atomi de Cu precipitați de zaharurile reducătoare sub formă de Cu_2O corespund însă două molecule de sulfat feros, adică doi atomi de fier, care vor fi ulterior oxidați prin titrare cu permanganat de potasiu.

Tabela 16

Tabela G. Bertrand pentru dozarea glucozei

Glucoză (mg)	Cupru (mg)	Glucoză (mg)	Cupru (mg)	Glucoză (mg)	Cupru (mg)
10	20,4	41	79,3	71	131,4
11	22,4	42	81,1	72	133,1
12	24,3	43	82,9	73	134,7
13	26,3	44	84,7	74	136,3
14	28,3	45	86,4	75	137,9
15	30,2	46	88,2	76	139,6
16	32,2	47	90,0	77	141,2
17	34,2	48	91,8	78	142,8
18	36,2	49	93,6	79	144,5
19	38,1	50	95,4	80	146,1
20	40,1	51	97,1	81	147,7
21	42,0	52	98,9	82	149,3
22	43,9	53	100,6	83	150,9
23	45,8	54	102,3	84	152,5
24	47,7	55	104,1	85	154,0
25	49,6	56	105,8	86	155,6
26	51,5	57	107,6	87	157,2
27	53,4	58	109,3	88	158,8
28	55,3	59	111,1	89	160,4
29	57,2	60	112,8	90	162,0
30	59,1	61	114,5	91	163,6
31	60,9	62	116,2	92	165,2
32	62,8	63	117,9	93	166,7
33	64,6	64	119,6	94	168,3
34	66,5	65	121,3	95	169,9
35	68,3	66	123,0	96	171,5
36	70,1	67	124,7	97	173,1
37	72,0	68	126,4	98	174,6
38	73,8	69	128,1	99	176,2
39	75,7	70	129,8	100	177,8
40	77,5				

În consecință, pentru calculul rezultatelor trebuie să se multiplice titrul soluției de $KMnO_4$, exprimat în Fe, cu coeficientul $\frac{63,57}{55,84} = 1,138$ pentru a obține titrul soluției $KMnO_4$ 5‰ în cupru.

Titrul soluției de $KMnO_4$ a fost stabilit față de o cantitate determinată de $(NH_4)_2C_2O_4 \cdot H_2O$, și se obține din relația:

$$a = \frac{63,57 \times 2}{142,12},$$

unde a este greutatea oxalatului de amoniu.

Fie b ml de $KMnO_4$ utilizați pentru titrare. Titrul permanganatului de potasiu 5‰ va fi egal cu:

$$X = \frac{a \times 0,8951}{b} = „c“ \text{mg Cu}.$$

Metoda G. Bertrand se aplică în condițiile unui laborator modern bine dotat. Numeroși cercetători au propus diverse modificări menite să lărgească sfera de acțiune a metodei în sensul utilizării ei în laboratoare și unități care nu dispun de filtrul Allihn sau de conducte de apă sub presiune.

O modificare esențială a metodei Bertrand a fost propusă de E. Macovschi și colaboratorii. Autorul rezolvă două probleme principale:

— înlocuirea filtrului Allihn cu un simplu filtru de hîrtie de filtru și

— protejarea oxidului cupros contra acțiunii directe a aerului, care îl poate oxida puternic.

Principiul metodei și calculul rezultatelor rămîn aceleași ca în metoda G. Bertrand, modul de lucru este însă diferit, de aceea se va descrie numai tehnica de lucru.

Într-un balon Erlenmeyer cu o capacitate de 250—300 ml se introduc 40 ml licoare Fehling (20 ml Fehling I+20 ml Fehling II) și 20 ml de soluție de glucoză sau hidrolizat de amidon. Concentrația glucozei în volumul soluției de analizat nu trebuie să depășească 100 mg. Amestecul se fierbe timp de 3 minute pe o sită de azbest la flacăra unui bec de gaz. La soluția încă fierbinte se adaugă 4 ml $ZnSO_4$ 20% și 6 g de $NaHCO_3$ solid. Se agită energic și după dizolvarea bicarbonatului se filtrează pe hîrtie de filtru cantitativă. Precipitatul de pe hîrtia de filtru se spală cu apă distilată fierbinte pînă cînd apele de spălare devin incolore și hîrtia de filtru pierde nuanța albăstruie inițială. În acest moment se schimbă recipientul de colectare a apelor de spălare și pe filtru se adaugă cu o pipetă 20—30 ml de sulfat feric pentru dizolvarea precipitatului. Filtrul este ulterior spălat cu apă bidistilată și lichidul din recipient se titrează cu $KMnO_4$, soluție 5‰. Calculul rezultatelor se face după principiul expus mai sus și folosind tabelul G. Bertrand.

Adăugarea $ZnSO_4$ la soluția alcalină rezultată după oxidarea glucozei preîntîmpină degradarea precipitatului de Cu_2O care s-a format. Utilizarea $NaHCO_3$ în metoda modificată de E. Macovschi și colaboratorii este condiționată de faptul că soluțiile de NaOH atacă filtrul de hîrtie, favorizînd reținerea cuprului. Bicarbonatul neutralizează NaOH cu formare de carbonat de sodiu.

Metoda G. Bertrand în modificarea descrisă mai sus este comodă, rapidă și dă rezultate similare cu cele obținute prin aplicarea rețetei originale. Ea prezintă avantaje incontestabile: poate fi utilizată pe scară largă în orice laborator și se pretează la analize în serie.

Calculul rezultatelor. Exemplu de calcul. Extractul analizat a fost obținut din 28,15 g de material vegetal uscat și volumul lui înainte de defecare a fost adus la 250 ml. Pentru defecare s-au folosit 25 ml, care au fost aduși la 100 ml. Pentru determinarea glucidelor reducătoare s-au recoltat

eșantioane a cîte 10 ml. Pentru titrare s-au utilizat 8,25 ml $KMnO_4$ 5‰, al cărui titru în cupru este de 6,40. Cantitatea glucozei în g% va fi egală cu:

$$8{,}25 \times 6{,}40 = 52{,}40 \text{ mg Cu} = 26{,}5 \text{ mg glucoză};$$

$$\frac{0{,}2650 \times 10}{28{,}15 \times 100} = 9{,}41 \text{ g\% glucoză}$$

3.3.4.2. Metoda Nelson-Somogyi[1]

Reactivi necesari: 1) Soluție pentru precipitarea proteinelor. *a*) Se dizolvă 20 g de $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ în 400 ml de apă distilată. *b*) Hidroxid de bariu, soluție aproximativ 0,3 *N*. Se dizolvă 19 g de $Ba(OH)_2 \cdot H_2O$ în 400 ml de apă distilată și soluția se conservă pentru evitarea contactului cu bioxidul de carbon.

Soluțiile (*a*) și (*b*) trebuie să se găsească într-un raport bine determinat: 5 ml din soluția de $ZnSO_4$ sînt diluați la 25 ml cu apă distilată și titrați dintr-o biuretă, cu soluție de $Ba(OH)_2$ în prezența fenolftaleinei ca indicator. Pentru titrare, cînd soluțiile sînt corect preparate, se utilizează aproximativ 4,7—4,8 ml de soluție de $Ba(OH)_2$, nuanța roză a soluției titrate persistînd timp de 1 minut. În cazul cînd soluția de $ZnSO_4$ este mai concentrată se recomandă diluarea prealabilă a acesteia pînă la obținerea raportului menționat mai sus față de soluția de $Ba(OH)_2$; 2) Reactiv Somogyi (reactivul cu $CuSO_4$). În aproximativ 700 ml de apă distilată se dizolvă 28 g de fosfat disodic anhidru și 40 g de tartrat dublu de sodiu și potasiu. La amestecul obținut, după dizolvarea completă a celor două substanțe, se adaugă cu pipeta 100 ml soluție normală de NaOH și se agită energic. Ulterior, se adaugă 80 ml soluție de $CuSO_4$, 10%. În final, se adaugă la aceeași soluție 180 g de sulfat de sodiu anhidru și după dizolvarea acestuia, soluția este adusă la 1 l cu apă distilată. Pentru precipitarea impurităților, soluția se lasă în repaus timp de 1—2 zile și lichidul este decantat, folosindu-se un filtru de hîrtie de bună calitate (!). Reactivul se conservă un timp îndelungat, dacă este păstrat în condiții corespunzătoare.

În cazuri speciale, de exemplu, cînd se urmărește dozarea activității enzimatice, se utilizează o variantă a reactivului Somogyi. În 800 ml de apă distilată se dizolvă 12 g de tartrat dublu de sodiu și potasiu, 24 g de Na_2CO_3, 16 g de $NaHCO_3$ și 144 g de Na_2SO_4 (soluția (*a*)). Separat se dizolvă în 200 ml de apă distilată 4 g de $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ și 36 g de Na_2SO_4. În momentul utilizării soluțiilor se amestecă 4 volume din soluția (*a*) cu 1 volum de soluție (*b*) și amestecul este imediat folosit. În aceste cazuri, pentru a pune în evidență acțiunea enzimatică este necesară crearea unui *p*H optim pentru enzima studiată, folosindu-se în acest scop soluții tampon adecvate; 3) *Reactiv* Nelson *(reactivul cu arsenomolibdat).* Se dizolvă 25 g de $(NH_4)_6 M_7O_{24} \cdot 4H_2O$ în 450 ml de apă distilată. După dizolvarea completă a reactivului la soluție se adaugă, picătură cu picătură, și agitîndu-se cu grijă, 21 ml de H_2SO_4 concentrat și apoi 3 g de $Na_2HAsO_4 \cdot 7H_2O$ dizolvate în prealabil în 25 ml de apă distilată. Soluția astfel preparată se conservă 24—48 de ore, la temperatura de 37°C, timp necesar pentru formarea complexului cromogenic, după care poate fi folosită. Conservarea soluției pe un termen mai îndelungat reclamă păstrarea în sticle brune, prevăzute cu dop rodat.

În cazul cînd folosirea reactivului este necesară imediat după preparare, Nelson recomandă încălzirea acestuia 25 de minute, la 55°C, soluția agitîndu-se din timp în timp, pentru evitarea punctelor de supraîncălzire. Acest procedeu este însă puțin recomandabil, deoarece poate provoca descompunerea complexului cromogenic; 4) *Soluție standard de glucoză sau xiloză.* În 100 ml de apă distilată se dizolvă 30 mg xiloză (glucoză). Soluția standard se conservă la rece (în frigider).

---

[1] Temă. După efectuarea lucrării să se formuleze principiul metodei și să se scrie reacțiile corespunzătoare.

Modul de lucru. Deproteinizarea materialului se realizează după tehnica Nelson: la 1 volum de sînge se adaugă 15 volume de apă distilată și 2 volume soluție de $Ba(OH)_2$ 0,3*N* și amestecul se agită energic. Cînd amestecul se colorează ușor în brun, se adaugă cu pipeta 2 volume soluție de $ZnSO_4$ și după 5 minute se filtrează.

În eprubete de 35—40 ml, prevăzute cu dop rodat, se pun cu pipeta 2 ml de filtrat și 2 ml reactiv Somogyi. Probele sînt introduse într-o baie de apă la 100°C, timp de 10 minute. După răcire, într-o baie de gheață, în fiecare probă se adaugă cîte 2 ml reactiv Nelson și volumul se aduce la 25 ml cu apă distilată. Probele sînt citite la fotometrul Pulfrich și cantitatea de zaharuri reducătoare prezente în sînge se calculează ținîndu-se seama de diluarea eșantioanelor de sînge și de cantitatea de zaharuri (exprimată în μg) care corespunde valorii *E* pe curbele etalon.

Obținerea curbei etalon și citirea probelor la fotometru. Curba etalon se obține folosind probe etalon de lucru, în care concentrația zaharurilor variază între 30 și 450 μg (v. tabela 17).

Tabela 17

Construirea curbei etalon pentru dozarea colorimetrică a zaharurilor reducătoare după metoda Nelson-Somogyi

Reactivi	Eprubeta nr.							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Soluție etalon de xiloză (80 μg/100 ml) (ml)	0,10	0,20	0,40	0,60	0,80	1,00	1,50	0,00 (martor)
Apă distilată (ml)	1,90	1,80	1,60	1,40	1,20	1,00	0,50	2,00
Reactiv Somogyi (ml)	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
Probele și martorul sînt introduse pentru 10 minute într-o baie de apă în clocot, apoi sînt răcite într-o baie de gheață.								
Reactiv Nelson (ml)	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
Apă distilată (ml)	19	19	19	19	19	19	19	19
Concentrația xilozei în probă (exprimată în μg)	30	60	120	180	240	300	450	00
Valorile E (media a două citiri)[1]	0,0575	0,122	0,230	0,352	0,443	0,548	0,774	—

[1] Citirea probelor s-a efectuat la spectrofotometrul Beckmann model DU, utilizîndu-se cuva de 1 cm.

Proba martor, care se utilizează pentru citirea probelor etalon și a probelor cu sînge la fotometru, constă din aceiași reactivi utilizați pentru probele etalon de lucru, cu excepția soluței de xiloză (sau a filtratului

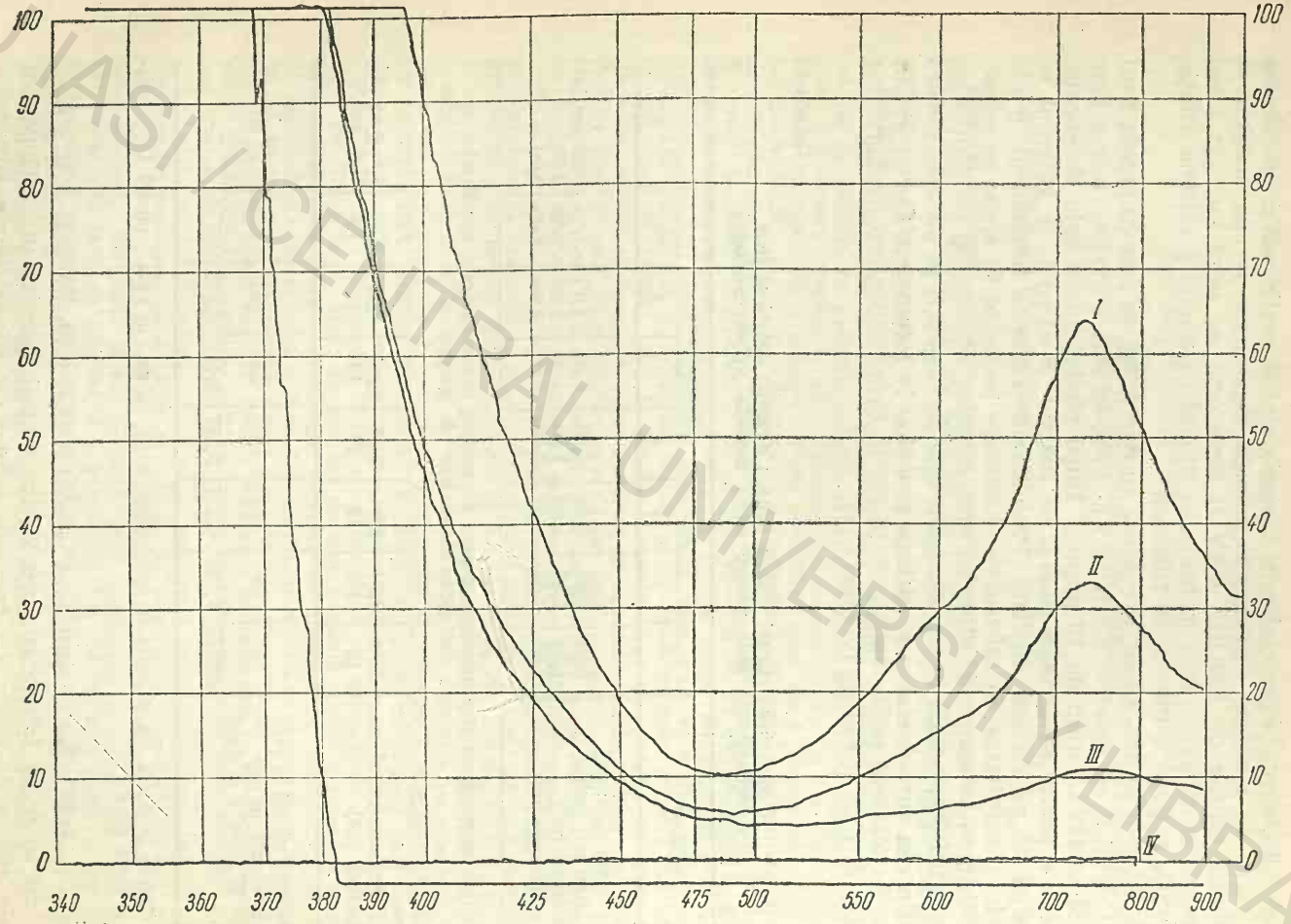


Fig. 46. Curba de absorbție obținută pentru două soluții etalon de xiloză:
I — probă care conține 60μg xiloză, într-un mililitru de soluție; *II* — aceeași probă diluată de 2 ori; *III* — proba martor; *IV* — punctul „zero" al aparatului de înregistrat

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

obținut după deproteinizarea sîngelui) care este înlocuită cu un volum echivalent de apă distilată.

Citirea probelor la fotometru. Nelson și Somogyi recomandă citirea probelor la lungimea de undă de 500—520 mμ. Halliwell (1962) menționează că citirea probelor la o lungime de undă superioară (660 mμ) nu este recomandabilă, deoarece procesele de reoxidare a cuprului pot condiționa valori considerabile pentru proba martor.

În figura 46 redăm curba de absorbție pentru soluțiile etalon de xiloză care conțin 30 și 60 μg și pentru proba martor. După cum se vede, legea Lambert-Beer este valabilă la $\lambda = 500—550$ mμ, iar valoarea martorului este la această lungime de undă într-adevăr considerabilă în comparație cu valorile probelor etalon. Maximum de absorbție este înregistrat la 740 mμ și valorile *E* obținute la această lungime de undă, atît pentru probele martor, cît și pentru probele etalon (v. tabela 17) și expuse în figura 47, demonstrează că legea Lambert-Beer este în întregime respectată. Citirea probelor s-a realizat imediat după colorare și 6 ore mai tîrziu, valorile extincției rămînînd foarte apropiate.

Temă. Să se obțină curba etalon pentru probele care conțin 120 și 180 μg de xiloză — și pentru proba martor la aparatul la care urmează să se citească probele și să selecționeze filtrul corespunzător.

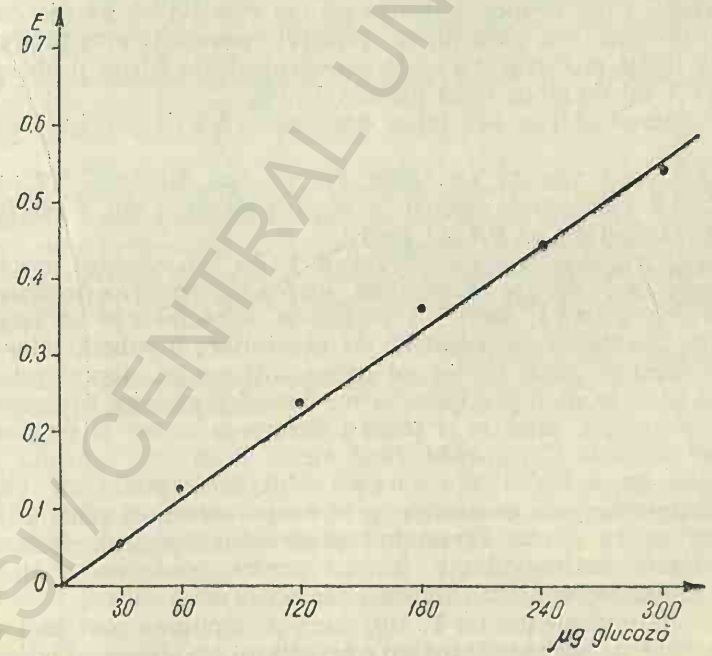


Fig. 47. Curba etalon pentru determinarea glucidelor după metoda Nelson-Somogyi.

Biblioteca Facultății de Chimie
BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Să se dozeze zaharurile reducătoare, prezente în sînge și în filtrate, obținute după diferite tehnici de deproteinizare a sîngelui și să se compare rezultatele.

3.3.4.3. Determinarea glucidelor reducătoare în sînge. Metoda Somogyi

Reactivi necesari: 1) Sulfat de zinc, soluție 5%; 2) Hidroxid de bariu, soluție 0,3 *N*. Soluția alcalină de $Ba(OH)_2$ trebuie să neutralizeze soluția de sulfat de zinc, volum la volum, cînd titrarea este realizată în prezența fenolftaleinei ca indicator. În acest scop, se diluează 10 ml soluție (1) cu apă distilată la un volum final de 100 ml și se titrează în prezența fenolftaleinei pînă la coloratia roză care persistă 1 minut; 3) Tiosulfat de sodiu, soluție 0,005 *N*. 4) Soluție de iodură de potasiu preparată în iodat de potasiu. Se dizolvă 8 g de KI în apă distilată, la care se adaugă 25 ml de soluție normală de iodat de potasiu și volumul este adus la 1 l cu apă distilată; 5) Acid sulfuric, soluție 2 *N*; 6) Reactiv Somogyi care conține Cu în soluție de fosfat-tartrat.

Modul de lucru. Se pun cu pipeta într-o eprubetă uscată 5 ml de apă distilată și 1 ml de sînge proaspăt recoltat. Pipeta este spălată de 2 ori cu apă distilată din eprubetă. Se adaugă 2 ml soluție de $Ba(OH)_2$ 0,3*N* și conținutul eprubetei se agită atent pentru omogenizare. Ulterior se adaugă cu pipeta 2 ml soluție de $ZnSO_4$ 5% și amestecul se agită energic și se filtrează. Cînd proporția dintre cei doi reactivi — soluția de $Ba(OH)_2$ și $ZnSO_4$ — este cea indicată (v. reactivi necesari), precipitarea proteinelor este totală și filtrarea rapidă. Fiecare ml din filtratul obținut corespunde la 0,1 ml de sînge total (diluția 1 : 10).

Pentru microdozări se pot folosi două procedee de precipitare a proteinelor.

Procedeul 1: se iau 0,1 ml sînge, 7,5 ml apă distilată, 0,2 ml $ZnSO_4$;

Procedeul 2: recomandă pentru fiecare 0,2 ml sînge cîte 3 ml de apă distilată, 0,4 ml $Ba(OH)_2$ și 0,4 ml $ZnSO_4$.

În procedeul 1 sîngele a fost diluat de 1 : 80, iar în cazul procedeului 2, diluarea este de 1 : 40. De observat că pentru precipitarea proteinelor după procedeul Somogyi, pentru 1 volum de sînge total se utilizează întotdeauna cîte 2 volume din reactivii de precipitare a substanțelor proteice. Acest procedeu se poate utiliza cu succes atît pentru deproteinizarea sîngelui total, cît și pentru precipitarea substanțelor proteice prezente în serul și plasma sanguină, precum și pentru defecarea urinei și deproteinizarea extractelor obținute din mușchi, ficat etc.

Avantajele procedeului Somogyi sînt remarcabile în cazul cînd filtratul obținut trebuie concentrat prin evaporarea unei părți a lichidului, lipsa sărurilor în filtrat favorizînd procesul evaporării. Hidroxidul de bariu precipită anticoagulanții folosiți pentru conservarea sîngelui, de exemplu, heparina, oxalatul, fluorura de sodiu etc.

Din filtratul obținut (diluat 1 : 10), după precipitarea proteinelor, se pun cu pipeta într-un pahar Hagedorn 2 ml, la care se adaugă 2 ml reactiv Cu-fosfat-tartrat. Probele se încălzesc timp de 10 minute pe o baie de apă în clocot și după răcire în fiecare se adaugă cu pipeta, agitîndu-se

energic, cîte 0,5 ml de soluție iodură de potasiu 2,5% și 1 ml soluție de H_2SO_4 2*N*. După completa limpezire a soluției, probele sînt titrate cu tiosulfat de sodiu 0,005*N* în prezență de amidon pînă la apariția culorii albastre. În paralel, se realizează două probe martor.

Calcularea rezultatelor este identică cu cea descrisă în cazul metodei Hagedorn-Jensen, însă utilizînd tabela Somogyi (tabela 18).

Tabela 18

Tabela Somogyi pentru calcularea glucozei (în mg%) în sîngele diluat de 1 : 10 și în cazul utilizării a 2 ml de reactiv cu Cu

Tiosulfat de sodiu 0,005 *N* (ml)	Tiosulfat de sodiu 0,005 *N* (ml)									
	0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9
	mg Glucoză în 100 ml de sînge sau plasmă									
0	0	11	18	25	32	40	47	54	61	68
1	75	82	89	95	103	110	117	124	131	137
2	143	149	155	162	169	175	182	189	195	202
3	209	215	221	228	234	241	248	254	261	268
4	275	281	288	295	302	309	315	322	329	336
5	342	349	356	263	370	376	383	389	396	403
6	409	416	422	429	436	443	449	456	462	469
7	476	482	489	496	503	510	516	523	529	536
8	543	549	556	563	570	577	583	590	596	603

Temă. Să se formuleze principiul metodei Somogyi și să se scrie ecuațiile reacțiilor corespunzătoare.

Observații. Metoda Somogyi pentru dozarea zaharurilor reducătoare în sîngele și plasma sanguină este comodă în cazul dozării substanțelor reducătoare în sîngele vertebratelor inferioare (batracieni, reptile etc.), sau cînd se studiază influența hormonilor care provoacă o hiperglicemie. În aceste cazuri este preferabilă, deoarece permite folosirea unui volum de sînge adecvat și exclude diluarea pe parcurs a soluțiilor, două surse incontestabile de erori în cazul dozării cantitative a zaharurilor reducătoare.

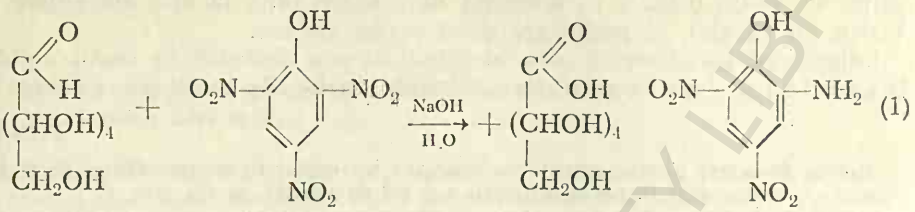
3.3.4.4. Determinarea glucozei în urină. Metoda Ionescu-Matiu

Prezența glucozei în urină este identificată calitativ prin reacțiile Trommer, Fehling, Nylander etc., iar determinarea cantitativă a acesteia poate fi realizată pe cale polarimetrică sau volumetrică prin metode bazate pe proprietățile reducătoare ale glucozei.

Cercetătorul român Ionescu-Matiu a imaginat o tehnică simplă, comodă și rapidă pentru dozarea glucozei în urină, care este utilizată curent în laboratorul clinic.

Principiul metodei. Glucoza în mediul alcalin reduce fericianura de potasiu la ferocianură de potasiu. Cînd întreaga cantitate de $K_3[Fe(CN)_6]$ prezentă în soluție a fost redusă la $K_4[Fe(CN)_6]$, glucoza reacțio-

neazã cu acidul picric, prezent în mediul de reacție ca indicator, reducîndu-l la acid picramic de culoare portocalie (1):



Glucoză — Acid picric — Acid gluconic — Acid picramic

Reactivi necesari: 1) Reactiv Courtonne. Se dizolvă 300 g acetat neutru de plumb în 500—600 ml de apă distilată. Se adaugă acid acetic concentrat pînă cînd soluția devine neutră față de hîrtia de turnesol. Se filtrează și volumul se aduce la 1 l cu apă distilată; 2) Glucoză, soluție 5‰; 3) Fericianură de potasiu, soluție. Se dizolvă 46 g de fericianură de potasiu și 46 g de hidroxid de sodiu în apă distilată (600—700 ml) și după răcirea soluției, volumul se aduce la 1 l; 4) Acid picric, soluție saturată la temperatura camerei. Aproximativ 1,5 g de acid picric, recristalizat din benzen, se dizolvă în 100 ml de apă distilată.

Modul de lucru

Defecarea urinei. În urina normală și patologică pe lîngă glucoză sînt prezente și alte substanțe reducătoare, de exemplu, creatinina, acidul uric și sărurile acestuia — urații, bilirubina etc. Din această cauză este necesar ca urina să fie supusă unui tratament prealabil, cunoscut sub numele de defecare. Pentru defecarea urinei se folosește reactivul Courtonne care, cu compușii organici enumerați mai sus, dă un precipitat insolubil, separat ulterior prin filtrarea urinei tratate.

Într-un balon Erlenmeyer de 100 ml se pun cu pipeta 9 ml de urină și 1 ml de soluție Courtonne, se agită energic amestecul și se filtrează. Filtratul obținut care reprezintă urina defecată este folosit pentru dozarea cantitativă a glucozei.

Dozarea glucozei. Se măsoară cu pipeta 10 ml soluție de fericianură de potasiu într-un balon Erlenmeyer de 100 ml, la care se adaugă 10 picături de soluție saturată de acid picric și 40—50 ml de apă distilată. După agitare conținutul balonului se încălzește la fierbere, pe o sită de azbest, la flacăra unui bec de gaz și se titrează la cald dintr-o biuretă cu urină defecată, pînă în momentul cînd culoarea soluției de $K_3[Fe(CN)_6]$ virează, la prima picătură în exces de urină defecată, de la galben la roșu-portocaliu. În timpul titrării, soluția titrată este agitată energic după adăugarea fiecărei picături de urină defecată.

Determinarea factorului soluției de $K_3[Fe(CN)_6]$. Pentru a se calcula cantitatea de glucoză prezentă în urina defecată, utilizată pentru reducerea a 10 ml de $K_3[Fe(CN)_6]$ la $K_4[Fe(CN)_6]$, este necesar să se cunoască factorul soluției de fericianură. În acest scop, într-un balon Erlenmeyer se introduc 10 ml de $K_3[Fe(CN)_6]$, la care se adaugă 10 picături de soluție saturată de acid picric și 40—50 ml de apă distilată. Amestecul

obținut se agită energic și se încălzește pînă la fierbere, titrîndu-se la cald cu o soluție de glucoză 5‰, pînă la apariția colorației roșii-portocalii a soluției. Cunoscînd numărul de ml soluție de glucoză 5‰ necesari pentru reducerea celor 10 ml de $K_3[Fe(CN)_6]$, precum și concentrația glucozei (exprimată în g‰) se calculează factorul soluției de fericianură.

Exemplu: Dacă pentru titrarea celor 10 ml de $K_3[Fe(CN)_6]$ s-au utilizat 12 ml soluție de 5‰, factorul de echivalență pentru soluția de fericianură va fi egal cu:

$$\frac{12 \times 5}{1\,000} = 0{,}06 \text{ g de glucoză.}$$

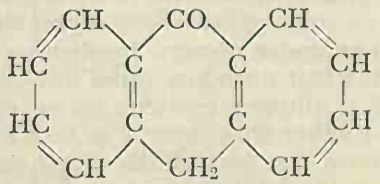
Calculul rezultatelor. Titrarea soluției de fericianură de potasiu cu urină defecată (2 probe paralele pentru fiecare eșantion de urină normală sau patologică) este realizată, de exemplu, folosindu-se 19,8 și 20,2 ml (20 ml de urină defecată, în medie). Cantitatea de glucoză în urină, ținînd seama de titrul soluției de $K_3[Fe(CN)_6]$, va fi egală cu 3 g‰, deoarece cei 20 ml de urină defecată corespund la 0,06 g glucoză (v. titrul soluției de fericianură de potasiu).

Pentru obținerea urinei defecate s-au utilizat 9 ml de urină inițială și 1 ml de reactiv Courtonne și, în consecință, la rezultatul astfel obținut (3 g‰) trebuie să se adauge, ținînd seama de diluție, 0,3 g de glucoză la 1 l de urină. Rezultatul corect va fi deci 3,3 g‰.

Valoarea diagnostică. În urina pacienților normali cantitatea de glucoză este de regulă mică, aproximativ 0,002 g‰. În cazul ingerării unei cantități considerabile de glucide, precum și consumului excesiv de produse zaharoase (dulciuri, prăjituri, ciocolată etc.), concentrația glucozei în urină crește temporar, condiționînd o glucozurie trecătoare, denumită glucozuria alimentară. În cazuri patologice, de exemplu, în diabetul zaharat, concentrația glucozei în sînge depășește limita pragului renal (1,5 g‰) și glucoza apare în urină.

3.3.4.5. Metoda cromatografică

Principiul metodei. Glucidele reducătoare, separate prin metoda cromatografiei pe hîrtie, sînt eluate și determinate. În prezența acidului sulfuric concentrat sînt degradate cu formare de derivați ai furfurolului care, condensîndu-se cu antrona, formează un complex colorat. Condensarea are loc între gruparea aldehidică a hidroximetilfurfurolului și gruparea metilenică activă a antronei:



Antrona

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Reactivi necesari: 1) Alcool etilic absolut: 2) Alcool etilic, 80%; 3) Eter de petrol, fracția care fierbe la 40—60°C; 4) Cărbune animal; 5) Acetat de plumb, 10% soluție neutră; 6) Sulfat de sodiu, soluție saturată; 7) Alcool butilic normal; 8) Acid acetic glacial; 9) Rezorcină; 10) Acid clorhidric, concentrat; 11) Anilinftalat, soluție 2%; 12) Antronă, soluție preparată în H_2SO_4 concentrat; 13) Glucoză, p.a.; 14) Galactoză; 15) Maltoză; 16) Fructoză; 17) Zaharoză.

Modul de lucru

Prepararea materialului vegetal pentru analiză. Se recoltează două probe a cîte 2 g din materialul în care urmează să se dozeze zaharurile și sînt tratate cu cîte 10 ml de alcool etilic fierbinte și, ulterior, introduse într-o baie de apă și încălzite la fierbere timp de 5 minute. După fierbere se adaugă apă distilată pînă la obținerea unei concentrații finale a alcoolului etilic de 80%. Proba de material vegetal, după această fixare prealabilă, este macerată într-un mojar și din nou tratată cu alcool etilic 80% și încălzită la fierbere timp de 30 de minute. După răcire, probele sînt centrifugate și precipitatul este spălat de 2 ori cu 2—4 ml de alcool etilic 80%. Centrifugatele reunite într-o pîlnie de separare sînt extrase cu eter de petrol (25 ml) și agitate energic timp de 15 minute. Se adaugă apoi cărbune animal, și probele se lasă în repaus timp de 12 ore. Probele sînt filtrate folosindu-se un filtru de hîrtie cutat, și filtrul se spală de 2—3 ori cu cîte 2—3 ml de apă distilată.

Probele rezultate sînt evaporate într-un creuzet de porțelan, pînă la obținerea unui volum de 5 ml și într-un termostat reglat la 50—60°C. Precipitarea proteinelor din extracte se efectuează adăugîndu-se, picătură cu picătură, soluție neutră de acetat de plumb 10%. După filtrarea probelor, excesul de acetat de plumb este îndepărtat prin adăugarea unei soluții saturate de sulfat de sodiu (cîteva picături). Probele sînt filtrate și evaporate la sec, într-o etuvă-termostat, la temperatura de 40—50°C.

Cromatografia cantitativă a zaharurilor. Reziduul rezultat după evaporarea probei la sec se dizolvă în 0,4 ml de apă distilată și cu ajutorul unui capilar se aplică pe hîrtia de cromatografie în cantități mici (9,4 µl). La o distanță de 2,5—3 cm de locul aplicării probei se aplică și o soluție de zaharuri reducătoare 2,5%, preparată în apă bidistilată. Soluția conține cantități egale din zaharurile reducătoare frecvent întîlnite în materialul vegetal: zaharoză, fructoză, glucoză și maltoză. Cromatografia se efectuează în camera cromatografică la temperatura de 22—28°C, folosindu-se ca solvenți amestecul de alcool butilic normal — acid acetic glacial — apă în proporție de 4 : 1 : 5. După prima cromatografiere, cromatogramele se usucă la temperatura camerei și sînt din nou supuse separării (recromatografiate). Operația de recromatografiere se repetă de 3 ori.

Developarea cromatogramelor. Pentru localizarea zaharozei și fructozei pe cromatograme, acestea sînt introduse rapid într-un amestec de rezorcină și acid clorhidric (1 : 9) și ulterior încălzite într-o etuvă, la 80°C, timp de 20 de minute. Fructoza și zaharoza apar sub forma unor spoturi colorate în roz. Glucoza și maltoza sînt identificate după cufundarea cromatogramelor într-o soluție de anilinftalat și apoi introduse într-o etuvă-termostat.

Pentru glucoză cromatogramele se expun 20 de minute, la temperatura de 80°C, iar pentru maltoză — 20 de minute, la 100—110°C.

Eluarea spoturilor. Spoturile roze, rezultate după reacţia fructozei şi zaharozei cu rezorcina în acid clorhidric, precum şi părţile rămase necolorate pe cromatogramele folosite pentru identificarea glucozei şi maltozei, sînt decupate, tăiate în făşii mici şi amestecate cu 3 ml de apă distilată. După 12 ore probele sînt filtrate într-un balon cotat de 10 ml. Fîşiile de hîrtie cromatografică sînt tratate din nou cu 3 ml de apă distilată şi încălzite la 60—70°C, timp de 30 de minute. Această operaţie de eluţie la cald se repetă de 2 ori. După filtrare volumul final al fiecărei probe, care conţine unul din zaharurile cercetate, se aduce la 10 ml şi se filtrează pentru îndepărtarea urmelor de fibre celulozice.

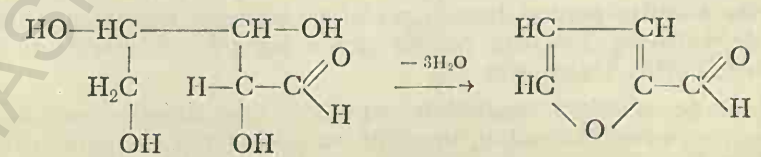
Determinarea cantitativă a zaharurilor reducătoare. Se ia 1 ml de eluat corespunzător zahărului care urmează să fie dozat, se pune cu pipeta pe peretele unei eprubete peste 3 ml de reactiv antronic şi proba se agită energic. Se introduc probele într-o baie de apă fierbinte (100°C), timp de 15 minute. În timpul fierberii se va evita cu grijă pătrunderea picăturilor de apă în probe, cea ce provoacă apariţia unei opalescenţe stabile. Probele, după răcire, sînt măsurate la fotoelectrocolorimetru la $\lambda = 650$ mμ. Citirea probelor se realizează utilizîndu-se o probă martor, care constă dintr-o suprafaţă de hîrtie cromatografică extrasă după acelaşi procedeu folosit şi pentru eluţia cromatogramelor.

Calculul rezultatelor se efectuează după procedeele obişnuite, folosindu-se valorile extincţiei şi o curbă etalon construită cu soluţia standard a zahărului dozat. (Modalitatea de obţinere a curbei vezi în capitolul Enzime — metoda de dozare a activităţii β-amilazei.) Pentru controlul metodei, din timp în timp, se procedează la cromatografierea unei cantităţi bine definite de glucid şi la dozarea lui în eluatele cromatogramelor.

3.3.5. DETERMINAREA PENTOZELOR ÎN ŢESUTURI

3.3.5.1. Metoda Mejbaum

Principiul metodei. Pentoza în mediu puternic acid este deshidratată cu formare de furfurol (1), care în prezenţa orcinei colorează soluţia în verde. Intensitatea coloraţiei este direct proporţională cu concentraţia pentozei în soluţia de analizat (1):



Pentoza — Furfurol (1)

Reactivi necesari: 1) Orcină (recristalizată din benzen), soluție 1%; se prepară dizolvînd 1 g de orcină în 100 ml soluție de clorură ferică 0,1% preparată în acid clorhidric concentrat. Se recomandă prepararea reactivului înainte de folosire; 2) Acid tricloracetic, soluție 5%; 3) Pentoză, soluție standard de bază. Se prepară o soluție care să conțină 20 μg într-un ml de soluție finală. Se păstrează la rece și se reface la fiecare 7 zile.

Modul de lucru. Țesutul (probe între 0,1 și 0,5 g, în funcție de natura țesutului și concentrația pentozei în acesta) este omogenizat și proteinele sînt precipitate cu acid tricloracetic, soluție 5%. Din extractul triclor-acetic obținut se recoltează două probe paralele pentru determinarea pentozelor.

În eprubetele prevăzute cu dop rodat se pun cu pipeta 1 ml de extract tisular și 3 ml soluție de orcină 1%. Eprubetele sînt ermetic închise și conținutul lor încălzit pe o baie de apă, la 100°C, timp de 20 de minute. După răcirea probelor, într-un curent de apă de robinet, se mai adaugă cu pipeta în fiecare 3 ml de apă distilată și probele sînt citite la fotocolorimetru în decursul primelor 30 de minute.

Citirea probelor la fotocolorimetru sau la fotoelectrocolorimetru necesită alegerea corespunzătoare a filtrului la care absorbția este maximă sau a lungimii de undă, în cazul folosirii spectrofotometrului. Absorbția este maximă, atît pentru probele cu extract tisular cît și pentru probele etalon de lucru la lungimea de undă de 660 mμ. La această lungime de undă, valoarea probei martor (exprimată în extincție) este minimă — 0,009 — 0,010.

Temă. Să se efectueze curba de absorbție pentru două probe etalon (8 și 16 μg de pentoză) la aparatul la care se vor citi probele și să se stabilească filtrul necesar pentru lucru.

Obținerea curbei etalon. Pentru calcularea rezultatelor este necesar să se cunoască concentrația pentozei în probele de analizat. În acest scop, se construiește curba etalon. Din soluția standard de pentoză (arabinoza), care conține 20 μg/ml soluție, se prepară o serie de soluții standard de lucru în care concentrația arabinozei variază între 4 și 20 μg (v. tabela 19).

Pentru citirea probelor la fotocolorimetru este necesară prepararea a două soluții martor, care conțin toți reactivii necesari pentru probele etalon cu arabinoză, în care ultima a fost înlocuită cu un volum corespunzător de apă distilată. Probele se încălzesc, după adăugarea soluției de orcină 1%, pe o baie de apă în clocot timp de 20 de minute, se răcesc și se citesc în decursul primelor 30 de minute.

Valorile *E* citite pentru fiecare probă în parte și corectate, ținîndu-se seama de valoarea *E*, citită pentru proba martor, sînt utilizate pentru construirea curbei etalon (fig. 48).

Temă. Să se calculeze rezultatele experimentale, ținînd seamă de cantitatea de țesut recoltată inițial, de diluarea probelor și utilizînd valorile *E* și curba etalon. Exprimați rezultatele în mg%.

Tabela 19

Construirea curbei etalon pentru dozarea pentozei în extractele tisulare după metoda Mejbaum

Reactivi	Eprubeta				
	1	2	3	4	5
Soluție standard de arabinoză (ml)	0,20	0,40	0,60	0,80	1,00
Apă distilată (ml)	0,80	0,60	0,40	0,20	0,00
Soluție de orcină 1% (ml)	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Probele sînt introduse pentru 20 de minute într-o baie de apă, la 100°C și apoi răcite într-un curent de apă de robinet					
Apă distilată (ml)	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00
Concentrația pentozei în probă (exprimată în μ g)	4	8	12	16	20
Valorile E citite la aparat[1]	0,1165	0,232	0,357	0,470	0,574

[1] În această rubrică sînt expuse valorile *E* citite la spectrofotometrul Beckmann, model DU și la λ =660 mμ și necorectate.

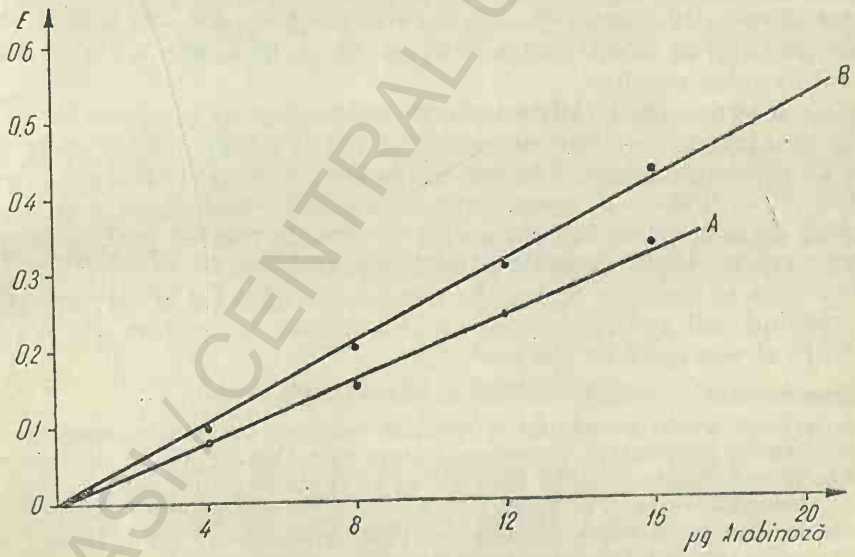


Fig. 48. Curba etalon pentru determinarea pentozelor după Mejbaum: *A* — curba obținută după citirea probelor la fotoelectrocolorimetrul FEK-N. 57 (cuva de 1 cm); *B* — curba etalon obținută la spectrofotometrul Beckman DU (cuva de 1 cm).

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

3.3.5.2. Metoda Roe și Rice[1]

Principiul reacției. **Pentozele, la cald și în mediu puternic acid, se descompun cu formare de furfurol. Furfurolul rezultat reacționează cu p-bromanilina, colorînd soluția în roșu aprins.**

Reactivi necesari: 1) p-bromanilină, soluție. În 100 ml de acid acetic glacial se dizolvă aproximativ 4 g de tiouree. Soluția se decantează și în acidul acetic saturat cu tiouree se dizolvă 2 g de p-bromanilină pură. Soluția se păstrează în flacoane de culoare închisă, prevăzute cu dop rodat și se reface la fiecare 8 zile. Tioureea, prezentă în soluția de p-bromanilină, joacă un rol de agent antioxidant, neparticipînd efectiv la reacție; 2) Reactivi pentru precipitarea proteinelor, după Roe și Rice; 3) Soluții standard de pentoză (d-arabinoză, 100 mg/l), preparată în acid benzoic. Soluțiile standard de lucru se prepară în momentul utilizării (0,1 mg/ml) prin diluarea soluției standard stoc cu acid benzoic.

Modul de lucru. Se recoltează o cantitate precisă de țesut, care se mojarează în prezența nisipului de cuarț și a 15 volume de apă. După mojarare se adaugă 2 volume soluție de $Ba(OH)_2$ 0,3*N* și din nou se mojarează. În final, la amestec se adaugă cu pipeta 2 volume soluție de $ZnSO_4$ 5%, se amestecă bine cu o baghetă și se filtrează. Se notează diluția.

Prepararea probelor pentru citirea la fotocolorimetru. În trei eprubete se pune cu pipeta cite 1 ml de filtrat tisular, 5 ml de p-bromanilină și amestecul se agită energic. Paralel, se realizează două probe martor care conțin cîte 1 ml de soluție etalon de arabinoză (soluția de lucru 0,1 mg/ml) și 5 ml de p-bromanilină.

Într-o baie de apă, încălzită la 70°C, se introduc două probe cu filtrat tisular și o probă cu soluția etalon de pentoză și se expun timp de 10 minute. Celelalte probe servesc pentru reglarea aparatului și ca probe martor cînd se citesc probele cu țesut. După 10 minute, eșantioanele sînt scoase din baia de apă, răcite într-un curent de apă de robinet pînă la temperatura camerei și citite imediat (!) la fotocolorimetru.

După cum se vede din figura 49, lungimea de undă (λ) la care absorbția este maximă atît pentru pentoze, ca d-arabinoza și d-xiloza, cît și pentru furfurol este egală cu 520 mμ[2].

---

[1] În tratarea acestei metode nu se specifică cantitatea de țesut necesară pentru dozare, deoarece concentrația pentozelor variază în funcție de natura țesutului, urmînd ca această problemă să fie rezolvată de către studenți. În modul de lucru se redau principalele etape și proporțiile dintre soluțiile folosite pentru obținerea extractului tisular. De asemenea, considerăm utilă rezolvarea de către studenți și a procedeelor de obținere a curbei-etalon și de calculare a rezultatelor.

[2] Selecționarea lungimi de undă la care urmează să se realizeze citirea probelor, în cazul utilizării spectrofotometrului automat, se poate realiza măsurînd probele etalon în absorbție sau în transmisie.

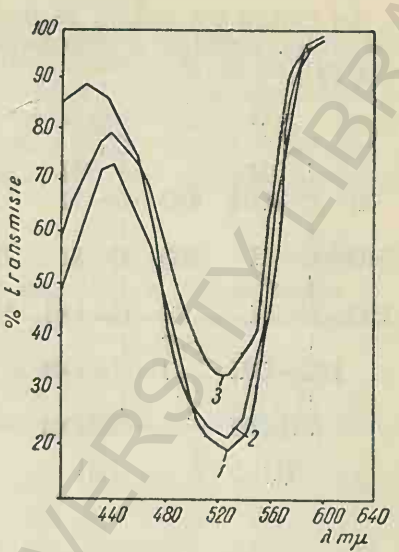


Fig. 49. Selecționarea lungimei de undă pentru citirea probelor la fotocolorimetrul Pulfrich:

1 — curba de absorbție a furfurolului; *2* — curba de absorbție a d-xilozei; *3* — curba de absorbție a d-arabinozei.

În metoda Roe și Rice tratamentul termic al probelor se realizează la o temperatură moderată (70°C) și în prezența acidului acetic, fapt care creează condiții optime pentru dozarea cantitativă a pentozelor.

În aceste condiții, p-bromanilina nu se descompune, coloratia soluției fiind exclusiv condiționată de reacția dintre aceasta și furfurol derivat din pentozele libere prezente în soluție.

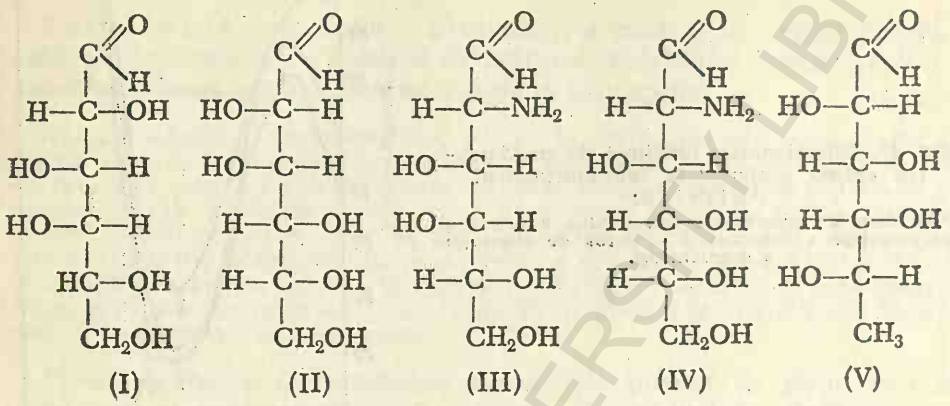
Tratamentul probelor la temperaturi mari 100—175°C (v. metoda Mejbaum) condiționează o formare suplimentară de furfurol datorită faptului că pe lîngă pentoze și derivații acestora (metilpentoze etc.), o sursă de furfurol o constituie acidul gluconic și acidul ascorbic.

Temă. Să se compare rezultate experimentale obținute după determinarea pentozelor în același extract tisular analizat după metodele Mejbaum și Roe și Rice.

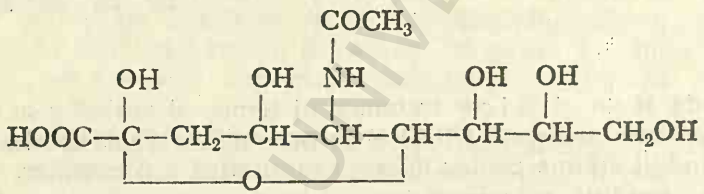
3.3.6. DETERMINAREA GLUCOPROTEIDELOR. METODA WINZLER

În sînge, pe lîngă glucidele reducătoare așa-zise „libere" care pot fi dozate colorimetric sau titrimetric, sînt prezente și glucide sub formă „combinată", identificate în majoritate în compoziția glucoproteinelor. S-a demonstrat că în compoziția glucoproteinelor serului sanguin se pot identifica relativ ușor următoarele componente de natură glucidică: galactoza (I), manoza (II), galactozamina (III), glucozamina (IV) și fucoza (V).

De curînd s-a stabilit că pe lîngă componentele enumerate mai sus, în structura chimică a glucoproteinelor se întîlnește și acidul neuraminic (VI).



(I) (II) (III) (IV) (V)



(VI)

Natura legăturii chimice dintre glucid și proteină în glucoproteine este încă necunoscută, elucidarea ei rămînînd o problemă de viitor.

Dozarea cantitativă a glucoproteinelor din ser se bazează pe reacția glucidelor prezente în structura acestora cu antrona, orcina, triptofanul, carbazolul etc. (cap. I).

Reactivi necesari: 1) Acid sulfuric, soluție diluată. În 40 ml de apă distilată se pun, picătură cu picătură și se agită cu grijă, 60 ml de H_2SO_4 concentrat; 2) Hidroxid de sodiu, soluție 0,1 *N*; 3) Alcool etilic, soluție 95%; 4) Orcină, soluție. Se dizolvă 1,5 g de orcină recristalizată din benzen în 100 ml de apă distilată. 7,5 ml de H_2SO_4, soluție diluată (1) se amestecă cu 1 ml de soluție de orcină în momentul folosirii; 5) Soluție standard de galactoză și manoză, care conține 200 μg glucid/ml de soluție (1 ml din această soluție standard trebuie să conțină 0,1 mg de galactoză și 0,1 mg de manoză). Se dizolvă 10 mg de galactoză și 10 mg de manoză (exact!) în 100 ml de apă distilată.

Modul de lucru. În tuburi conice de centrifugă se recoltează două probe paralele de ser a cîte 0,1 ml, la care se pune cu o pipetă 5 ml de alcool etilic 95% și conținutul lor se agită energic. Probele sînt centrifugate timp de 15 minute la 6 000—7 000 turații/minut și partea alicotă se decantează prin sifonare. Precipitatul proteic din tuburile de centrifugă se dizolvă într-un mililitru de soluție de NaOH 0,1*N*. Cînd proteinele (apro-

ximativ 2—10 mg de proteine) sînt complet dizolvate, se adaugă cu pipeta 8,5 ml soluție de orcină în acid sulfuric diluat (soluțiile (1) și (4) se amestecă în proporție de 7,5 : 1 v/v) și conținutul tuburilor de centrifugă se agită cu grijă. Proba martor constă din 2 ml de apă distilată și 8,5 ml de orcină în acid sulfuric. Pentru obținerea curbei etalon se realizează o serie de soluții standard de diferite concentrații care sînt tratate în același mod ca și probele de cercetat (tabela 20).

Tabela 20

Construirea curbei etalon pentru dozarea cantitativă a glucoproteidelor

Reactivi (ml)	Eprubeta				
	1	2	3	4	5
Soluție etalon de galactoză — 200 μg/ml (ml)	0,20	0,30	0,40	0,50	0,60
Apă distilată (ml)	1,80	1,70	1,60	1,50	1,40
Orcină, soluție diluată preparată în H_2SO_4 (ml)	0,50	8,50	8,50	8,50	8,50
Probele se încălzesc pe o baie de apă, la 80°C, 15 minute. Se răcesc într-un curent de apă și imediat se citesc la fotoelectrocolorimetru.					
Concentrația galactozei în probă, exprimată în μ g.	40	60	80	100	120
Extincția probelor[1]	0,031	0,948	0,061	0,091	0,101

[1] Probele au fost citite la spectrofotometrul Beckmann, model DU, folosindu-se cuva de 1 cm și la lungimea de undă de 540 mμ.

Probele cu ser, martorul și probele etalon sînt introduse într-o baie de apă la 80°C, timp de 15 minute (exact!). După fierbere conținutul eprubetelor se răcește într-un curent de apă de robinet și probele se citesc la unul din aparatele folosite în colorimetrie (fotocolorimetrie sau spectrofotometrie), selecționîndu-se în mod corespunzător filtrul sau λ la care absorbția pentru probele etalon este maximă.

În figura 50 se redă curba de absorbție realizată pentru proba martor și trei probe cu soluție standard ce conțin 60, 100 și, respectiv, 140 μg de galactoză și arabinoză. După cum se vede, legea Lambert-Beer rămîne valabilă la $\lambda = 540$ mμ, lungime de undă la care valoarea martorului este însă suficient de mare, valorile E oscilînd între 0,0275 și 0,028. Întrucît, la toate celelalte lungimi de undă, absorbția nu este direct proporțională cu concentrația soluțiilor cercetate, cînd grosimea stratului soluției de cercetat rămîne constantă, se recomandă citirea probelor la $\lambda = 540$ mμ.

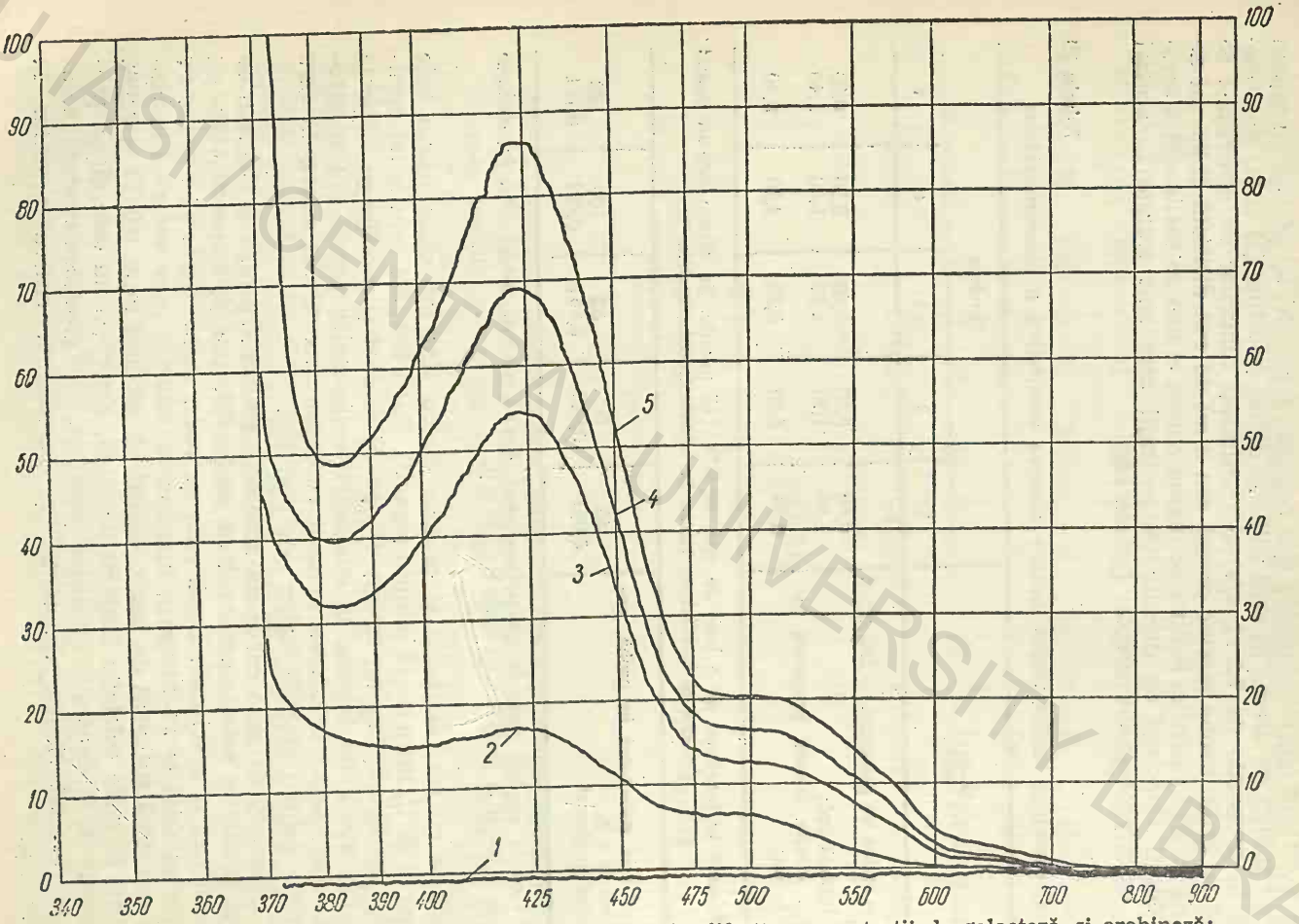


Fig. 50. Curba de absorbție a probelor care conțin diferite concentrații de galactoză și arabinoză:
1 — linia zero a aparatului de înregistrat; *2* — absorbția pentru proba martor; *3* — absorbție pentru proba care conține 60 μ g arabinoză și galactoză; *4* — curba de absorbție pentru proba care conține 100 μ g de arabinoză și galactoză; *5* — curba de absorbție pentru proba care conține 140 μ g arabinoză și galactoză.
Absorbția a fost înregistrată automat la spectrofotometrul Beckman DU.

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

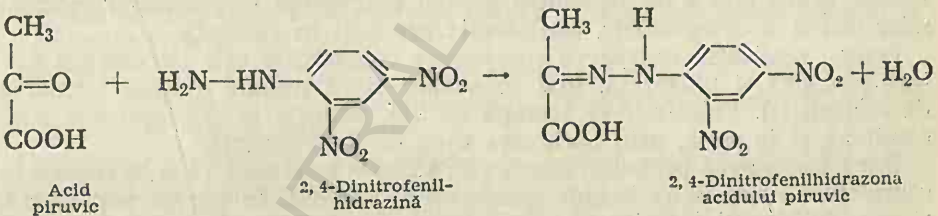
Citirea probelor la lungimea de undă de 540 mμ este, de asemenea, condiționată și de faptul că la această λ fucoza și acidul neuraminic nu influențează rezultatele, deși ambele substanțe sînt prezente în probele cu ser. Menționăm, de asemenea, că legea Lambert-Beer, după rezultatele obținute de noi, folosind spectrofotometrul Beckmann DU și cuva de 1 cm, rămîne valabilă în limita concentrațiilor cuprinse între 10 și 120 μg de hexoze în 10,5 ml de soluție finală (soluție standard plus reactivi).

Cantitatea hexozaminelor în serul sanguin al pacienților normali variază între 75 și 80 mg%, dozarea glucoproteidelor prezentînd un interes clinic incontestabil.

3.3.7. DETERMINAREA PRODUȘILOR METABOLISMULUI INTERMEDIAR

3.3.7.1. Determinarea acidului piruvic în țesuturi. Metoda Friedmann și Haugen

Principiul metodei. Acidul piruvic este precipitat din extractul analizat sub formă de 2,4 — dinitrofenilhidrazonă. Hidrazonele diferiților cetoacizi sînt extrase și separate cu ajutorul toluenului, iar hidrazona acidului piruvic este determinată apoi pe cale colorimetrică.



Acid piruvic — 2, 4-Dinitrofenil-hidrazină — 2, 4-Dinitrofenilhidrazona acidului piruvic

Reactivi necesari: 1) 2,4-dinitrofenilhidrazină, soluție 0,2% preparată în HCl. Se dizolvă 0,2 g de 2,4-dinitrofenilhidrazină într-un amestec, care constă din 42 ml de HCl concentrat (d=1,19) și 50 ml de apă distilată, prin încălzire pe o baie de apă. Soluția se aduce după răcire la 100 ml cu apă distilată; 2) Carbonat de sodiu, soluție 10%; 3) Acid tricloracetic, soluție 5%; 4) Piruvat de sodiu, în preparat chimic pur; 5) Toluen.

Modul de lucru. Probele de țesut de 0,8—1 g se mojarează cu nisip de cuarț și se trec cantitativ cu ajutorul a 5 ml soluție de acid tricloracetic 5%, ținut la rece, în tuburi de centrifugă. Mojarul se spală apoi cu încă 5 ml de CCl_3COOH, care se adaugă la preparatul anterior și conținutul tuburilor de centrifugă se agită energic și se răcește pe o baie de apă cu gheață. După 10—15 minute, probele sînt centrifugate la 3 000—5 000 turații/minut și partea alicotă decantată atent în eprubete curate. Din filtratul astfel obținut se recoltează probe de 4 ml și se trec

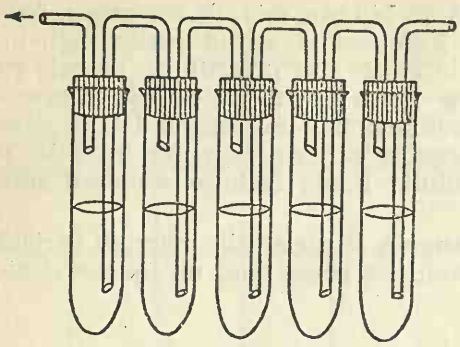


Fig. 51. Instalație pentru barbotarea eșantioanelor în care se dozează acidul piruvic.

în eprubetele conice (fig. 51) în care prealabil s-a pus cîte 1 ml soluție de 2,4-dinitrofenilhidrazină 0,2%, preparată în HCl. Conținutul eprubetelor se agită cu grijă și pentru desăvîrșirea reacției dintre acidul piruvic și 2,4-dinitrofenilhidrazină, probele sînt lăsate în repaus la temperatura camerei, timp de 10—15 minute.

Proba martor constă din 4 ml de apă distilată și reactivii corespunzători utilizați pentru probele cu extract tisular și se prelucrează paralel și identic. Proba martor se realizează în două exemplare, care trebuie să fie perfect limpezi.

Probele cu extract tisular și martorul se încălzesc pe o baie de apă la 35—37°C, timp de 10—15 minute și după răcire se adaugă cu pipeta în fiecare probă cîte 4 ml de toluen pentru extragerea hidrazonelor cetoacizilor (acizii α-cetoglutaric, oxaloacetic prezenți în extract).

Pentru realizarea extragerii complete a cetoacizilor este necesară o agitare energică și uniformă, însă în același timp trebuie evitată formarea de emulsii (!). Folosindu-se trompa de vid, probele se pot prelucra concomitent, și în serie, prin barbotare timp de 3—5 minute.

După barbotarea probelor, acestea sînt lăsate în repaus pînă la separarea completă a celor două lichide nemiscibile: toluenul în partea superioară, și apa, în stratul inferior al amestecului. Stratul inferior, apos, care nu conține hidrazone, este îndepărtat prin sifonare, folosindu-se în acest scop o pipetă cu bulă sau un tub capilar conectat la trompa de vid. În cazul cînd stratul inferior apos este ușor colorat, ceea ce dovedește prezența fenilhidrazonelor cetoacizilor, la amestec se adaugă 1—2 ml de toluen și extragerea cetoacizilor prin barbotarea soluției se repetă.

Extractul de toluen, în care se găsesc hidrazonele cetoacizilor, este tratat, în continuare, cu 4 ml soluție de Na_2CO_3 10%. Carbonatul de sodiu extrage în mod selectiv hidrazona acidului piruvic. Extragerea hidrazonei acidului piruvic se realizează tot prin barbotarea amestecului. Extragerea completă a 2,4-dinitrofenilhidrazonei acidului piruvic se realizează prin repetarea tratării extractului de toluen, care conține hidrazonele cetoacizilor, cu un volum total de 6 ml de Na_2CO_3. De regulă, cea de-a doua extragere nu indică prezența hidrazonei acidului piruvic, soluția de carbonat de sodiu fiind incoloră. În cazul cînd soluția de Na_2CO_3 prezintă reflexe

galbene-aurii, cele două extracte sodice se unesc, se agită energic în scopul omogenizării și pentru dozarea acidului piruvic se iau 4,5 ml (în cazul unei singure extrageri — 3 ml), care corespund la 3 ml de filtrat neproteic inițial.

Prepararea probelor pentru citirea la fotocolorimetru. În eprubetele perfect uscate și curate (!) se măsoară cu o pipetă exact 3 ml de extract sodic (sau 4,5 ml, v. mai sus) și 1,5 ml soluție de NaOH 1,5*N*. Apare o coloratie roșie-închisă, relativ stabilă și specifică pentru 2,4-dinitrofenilhidrazona acidului piruvic. Deoarece în extractul sodic sînt prezente și cantități neînsemnate de hidrazone ale acizilor α-cetoglutaric și acetoacetic, care sînt însă instabile și dispar repede, citirea la fotocolorimetru se face la lungimea de undă de 465 mμ. Valorile *E* sînt utilizate ulterior pentru determinarea conținutului de acid piruvic în proba de țesut cu ajutorul curbei etalon.

Obținerea curbei etalon. Se prepară o soluție standard de piruvat de sodiu, care conține 4,65 mg hidrazonă de acid piruvic în 50 ml de soluție 10% Na_2CO_3. Se prepară o serie de probe în care conținutul acidului piruvic variază între 5 și 40 μg (v. tabela 21) la care se adaugă 1 ml soluție de acid tricloracetic 20% și probele se aduc la 3 ml volum final cu apă distilată. Din fiecare probă etalon de lucru se recoltează ulterior 1,5 ml de soluție la care se adaugă cu pipeta 1 ml soluție de 2,4-dinitrofenilhidrazină 0,2%. În continuare probele sînt tratate cu toluen (4 ml), Na_2CO_3, soluție 10% (4 ml) ca și în cazul probelor cu extract tisular.

Pentru citirea la fotocolorimetru se utilizează 3 ml din extractul sodic final, sau 4,5 ml, dacă s-au efectuat două extrageri succesive, precum și 1,5 ml soluție de NaOH 1,5 *N*.

Înscriind pe ordonată valorile extincției (*E*), iar pe abscisă, valorile concentrației acidului piruvic în probele etalon folosite pentru citirea la fotocolorimetru se obține curba etalon.

Calcularea cantității de acid piruvic în probele cu extract tisular. Cu ajutorul valorii *E* citite pentru proba de cercetat și utilizînd curba etalon, se găsește cantitatea de acid piruvic prezentă în cei 3 ml de extract sodic care corespund la 3 ml de filtrat inițial.

Cantitatea de acid piruvic, exprimată în mg%, în proba de țesut recoltat inițial pentru analiză se calculează după formula:

$$x = \frac{a \times 100}{b \times 1\,000},$$

unde:

a este cantitatea de acid piruvic, exprimată în μg, citită pe curba etalon și corespunzătoare la 3 ml de filtrat inițial;

b — cantitatea de țesut, exprimată în grame, recoltată inițial pentru obținerea extractului tisular.

Importanța practică. Cantitatea acidului piruvic în țesuturi este relativ constantă și variază în funcție de starea fiziologică a organismului sau a organului studiat. De exemplu, în țesutul hepatic al șobolanului, cantitatea

Tabela 21

Construirea curbei etalon pentru dozarea acidului piruvic în țesuturi după metoda Friedman-Hauger

Reactivi	Eprubeta							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Soluție standard de acid piruvic (ml)	0,25	0,50	0,75	1,00	1,25	1,50	1,75	2,00
Apă distilată	2,75	2,50	2,25	2,00	1,75	1,50	1,25	1,00
Acid tricloracetic, soluție 20% (ml)	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Soluție recoltată pentru dozarea acidului piruvic (ml din amestecul obținut)	1,50	1,50	1,50	1,50	1,50	1,50	1,50	1,50
Soluție 0,2% de 2,4-dinitrofenilhidrazină (ml)	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Total (ml)	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
Probele sînt barbotate, evitîndu-se formarea emulsiei, pentru extragerea 2,4-dinitrofenilhidrozonelor cetoacizilor.								
Carbonat de sodiu, soluție 10%	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
Probele sînt barbotate atent și 2,4-dinitrofenilhidrazona acidului piruvic este extrasă selectiv de soluția de carbonat de sodiu.								
Extract sodiu, utilizat pentru fotocolorimetrie	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00
Soluție NaOH, 1,5 *N* (ml)	1,50	1,50	1,50	1,50	1,50	1,50	1,50	1,50
Concentrația acidului piruvic în probă (μg)	1,7	3,4	5,5	6,7	8,4	10,1	11,8	13,5
Extincția[1]	0,05	0,10	0,15	0,19	0,24	0,28	0,32	0,38

[1] În tabel sînt redate valorile *E* corectate și citite la fotoelectrocolorimetrul FEK-H-57, λ=465 mμ, cuva 1 cm.

de acid piruvic este de 1,7 mg% în stare normală, 1,4 mg% cînd animalul a fost ținut sub narcoză, iar în țesutul muscular, de 3,4 mg% și respectiv — 1,3 mg%.

Metoda Friedmann-Haugen este frecvent folosită în laboratorul de biochimie pentru explorarea diferitelor stări fiziologice ale organismului animal.

BCU Cluj / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

3.3.7.2. Determinarea acidului lactic. Metoda Clausen

Principiul metodei. **Acidul lactic, prezent în sînge sau în plasma sanguină, în mediu acid şi sub influenţa permanganatului de potasiu (ca agent oxidant) trece în acetaldehidă, bioxid de carbon şi apă după ecuaţia (1):**

$$CH_3—CH(OH)—COOH+O \rightarrow \begin{matrix} CH_3 \\ | \\ C{=}O \\ | \\ H \end{matrix} + CO_2 + H_2O. \qquad (1)$$

Acetaldehida formată este distilată şi captată cu ajutorul unei soluţii de $NaHSO_3$ (2):

$$\begin{matrix} CH_3 \\ | \\ C{=}O \\ | \\ H \end{matrix} + NaHSO_3 \rightarrow \begin{matrix} CH_3 \\ | \\ CHOH. \\ | \\ SO_3Na \end{matrix} \qquad (2)$$

În mediu acid, compusul bisulfitului cu aldehida acetică se descompune cu formarea unei cantităţi echivalente de $NaHSO_3$ care este dozat iodometric (3):

$$NaHSO_3+I_2+2NaHCO_3=NaHSO_4+2NaI+H_2O+2CO_2. \qquad (3)$$

Reactivi necesari: 1) Sulfit acid de sodiu, soluţie *N*/50; 2) Permanganat de potasiu, soluţie *N*/200; 3) Iod, soluţie *N*/10; 4) Iod, soluţie *N*/200; 5) Amidon, soluţie 1%; 6) Bicarbonat de sodiu, soluţie saturată preparată imediat înainte de întrebuinţare; 7) Sulfat de cupru, soluţie saturată (în apă distilată); 8) Acid sulfuric, soluţie 2%; 9) Oxid de calciu, pur; 10) Acid sulfuric concentrat, p.a.; 11) Permanganat de potasiu, soluţie saturată.

Modul de lucru

Deproteinizarea plasmei sanguine şi eliminarea glucozei. Într-un tub de centrifugă cu o capacitate de 50 ml se pun cu o pipetă 3 ml (exact!) de plasmă şi 21 ml de apă bidistilată. La conţinutul tubului de centrifugă, care este bine agitat, se adaugă prudent 2,1 g de oxid de calciu şi 6 ml de soluţie saturată de sulfat de cupru. Amestecul se agită energic, evitîndu-se însă formarea de emulsie şi se lasă în repaus timp de 1 oră, agitîndu-se din timp în timp. După o oră probele sînt centrifugate la 3 500—4 500 turaţii/minut. Partea alicotă trebuie să fie perfect clară şi să prezinte reacţii negative pentru glucoză şi prezenţa proteinelor (v. reacţiile calitative descrise anterior).

Distilarea acetaldehidei. *Descrierea aparatului de distilare.* Aparatul de distilare se compune din trei părţi: balonul *a*, refrigerentul *b* şi vasele de

captare *c* şi *d* care sînt unite prin intermediul legăturilor de cauciuc (fig. 52). Balonul *a* este prevăzut cu un tub de sticlă *e*, efilat la partea inferioară care este cufundată în lichid şi o pîlnie *f* prevăzută cu dop rodat şi un braţ lateral *g* cu care se conectează balonul *a* la refrigerentul *b*. Vasele de captare se leagă la trompa de vid în momentul funcţionării aparatului.

În balonul *a* se introduc 10 ml de filtrat, care corespund la 1 ml de ser sanguin diluat 1 : 10, şi 5 ml soluţie de acid sulfuric 2%. În vasele de captare *c* şi *d* se măsoară cu o pipetă 20 ml de soluţie de bisulfit de sodiu *N*/50. Trompa de vid este acţionată pentru a asigura barbotarea lichidului (mediului de reacţie) din balonul *a*. Prin tubul de sticlă *e* se introduce aer dintr-o sursă purificată, fără vapori de acetonă. În acest scop, aerul este trecut printr-un vas spălător Tişcenco în care se găseşte o soluţie saturată de permanganat de potasiu şi la care s-a adăugat un volum de acid sulfuric concentrat egal cu 5% din volumul de $KMnO_4$. Conţinutul balonului *a* se încălzeşte la fierbere. În momentul cînd lichidul din balon fierbe se introduc, cu ajutorul pîlniei *f*, cantităţi mici de soluţie de permanganat de potasiu *N*/200, la intervale de timp reglate, astfel încît fiecare nouă adăugare de $KMnO_4$ se realizează după completa decolorare a cantităţii adăugate anterior. Cînd în balonul *a* permanganatul de potasiu adăugat nu se mai decolorează, distilarea se consideră terminată şi barbotarea lichidului este continuată încă 10 minute. Proba martor se realizează înlocuind serul cu apă bidistilată.

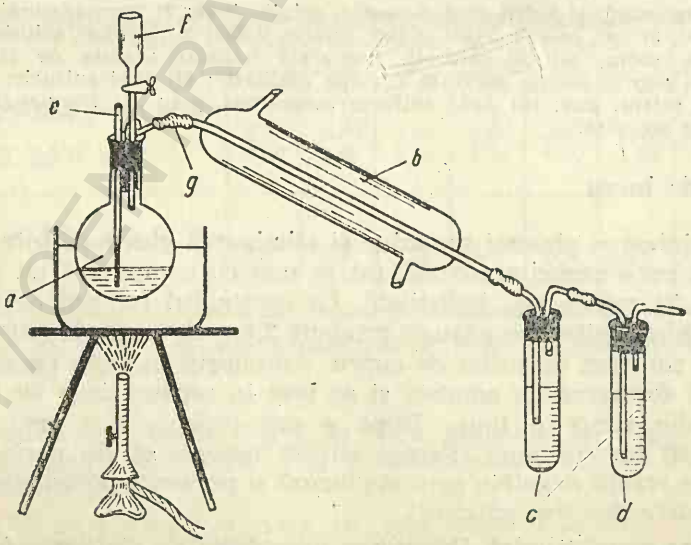


Fig. 52. Instalaţie pentru distilarea acetaldehidei.

Titrarea probelor. Conţinutul celor două vase de captare se trece cantitativ într-un balon Erlenmeyer de 100—150 ml. Se adaugă 4—5 picături soluţie de amidon 1% şi soluţie de iod *N*/50 pînă la colorarea în albastru a soluţiei. Bisulfitul de sodiu, care nu a participat în reacţia (2) de captare a acetaldehidei, a fost astfel îndepărtat din mediul de reacţie. Adăugîndu-se 10 ml de soluţie saturată de bicarbonat de sodiu se pune în libertate o cantitate de bisulfit de sodiu echivalentă cantităţii de acetaldehidă prezentă în proba iniţială. Bisulfitul de sodiu eliberat este titrat cu soluţie de iod *N*/200, dintr-o microbiuretă pînă în momentul cînd soluţia titrată se colorează în albastru, culoare stabilă timp de 2—3 minute.

Calculul rezultatelor. 1 ml soluţie de iod *N*/200 corespunde la 0,225 mg de acid lactic. Cantitatea de acid lactic în proba de cercetat, minus valoarea martorului, va fi egală cu:

$$x = \frac{ax\ 0{,}225 \times 30}{10 \times 3} = \text{mg acid lactic},$$

unde:

a este diferenţa, în ml, de soluţie de iod *N*/200, dintre proba cu sînge şi proba martor;
0,225 — miligrame de acid lactic care corespund la 1 ml de soluţie de iod *N*/200;
30 — volumul final al amestecului iniţial (deproteinizarea serului);
10 — volumul de filtrat utilizat pentru dozarea acidului lactic;
3 — ml de plasmă, utilizată pentru defecare.

Valoarea diagnostică. Metoda Clausen pentru dozarea acidului lactic este frecvent folosită în laboratorul clinic. În sîngele pacienţilor normali, cantitatea de acid lactic variază între 1,5 şi 2,2 mg%. Concentraţia acidului lactic în sînge creşte după efortul fizic (pînă la 14 mg%), în stările de intoxicaţie, în timpul sarcinii, în afecţiunile pulmonare etc.

3.3.7.3. Determinarea acidului citric. Metoda Natelson, Pincus, Lugovoy

Principiul metodei. Acidul citric în mediu acid şi în prezenţa de brom şi permanganat de potasiu trece în pentabromacetonă, care reacţionînd cu tioureea colorează soluţia în galben.

Reactivi necesari: 1) Permanganat de potasiu, soluţie 5%; 2) Apă oxigenată, soluţii 3% şi 6%; 3) Acid sulfuric, soluţie 18 *N*; 4) Acid tricloracetic, soluţie 10%; 5) Tiouree — se prepară o soluţie care conţine 4 g de tiouree şi 2 g de tetraborat de sodiu ($Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$) la 100 ml de apă bidistilată; 6) Brom, soluţie apoasă care conţine 110,02 g de bromură de potasiu la 1 l de apă distilată; 7) Tetraborat de potasiu, preparat; 8) Eter de petrol, fracţia cu punctul de fierbere între 80 şi 90°C.

Modul de lucru. Într-un tub de centrifugă în care s-au măsurat cu pipeta 3 ml soluție de acid tricloracetic 10% se introduce o probă de țesut de 0,4—0,5 g și volumul total se aduce la 5 ml cu acid tricloracetic. Pentru extragerea completă a acidului citric din țesutul analizat, probele sînt agitate energic cu ajutorul unui agitator mecanic timp de 30 de minute și ulterior centrifugate 5 minute. Dacă centrifugatul este opalescent se filtrează. Din partea alicotă a centrifugatului se recoltează probe a cîte 3 ml și se introduc în eprubete cu dop rodat prevăzute cu diviziuni corespunzătoare la un volum egal cu 0,4 ml. La probe se adaugă 0,04 ml acid sulfuric 18 *N* și conținutul eprubetelor se evaporă pe o baie pînă la un volum final de 0,4 ml. Evaporarea probelor se efectuează pe o baie de ulei sau cu soluție saturată de clorură de calciu. Temperatura optimă la care evaporarea decurge în condiții normale este de 115—120°C.

În paralel se fac și două probe de control, în care extractul tricloracetic al țesutului este înlocuit cu soluție de acid tricloracetic 10%. Tratarea probelor cu extract tisular și a probelor de control se face începînd din acest moment în paralel și identic.

Cînd volumul probelor este de 0,4 ml se procedează la răcirea lor la temperatura camerei. Se adaugă apoi cu pipeta 0,04 ml soluție bromură de potasiu și după 10 minute, 0,1 ml soluție permanganat de potasiu 5%. În aceste condiții experimentale, acidul citric se transformă cu formare de pentabromacetonă. Excesul de permanganat de potasiu prezent în probe este îndepărtat prin tratarea acestora cu soluție de perhidrol 6%. Înainte de adăugarea perhidrolului se recomandă ca probele să fie răcite într-o baie de zăpadă carbonică. În scopul evitării excesului de perhidrol care influențează negativ asupra rezultatelor este necesar să se utilizeze soluție de H_2O_2 mai diluată (3%).

Pentabromacetona rezultată este extrasă din amestecul de reacție cu ajutorul eterului de petrol. În acest scop, la amestecul de reacție se adaugă 1,4 ml de eter de petrol. Eprubetele se închid ermetic cu dopul rodat și probele sînt agitate timp de 10 minute și apoi centrifugate. Extractul de pentabromacetonă în eter de petrol (1 ml) se introduce într-o eprubetă cu dop rodat peste 3,5 ml soluție de tioureе. Conținutul eprubetelor se agită energic timp de 5 minute, probele sînt centrifugate și eterul de petrol îndepărtat prin încălzire pe o baie de apă caldă.

Soluția de pentabromacetonă în prezența tioureei se colorează în galben. Intensitatea colorației este estimată la spectrofotometru, la lungimea de undă corespunzătoare, $\lambda = 445$ mμ.

Construirea curbei etalon. În calitate de standard se utilizează o soluție de acid citric chimic pur. 100 miligrame de acid citric se dizolvă în 100 ml soluție de acid sulfuric 1 *N*. Un ml de soluție standard corespunde la 1 000 μg de acid citric. În momentul utilizării, soluția standard se diluează de 10 ori cu ajutorul soluției de acid sulfuric 1 *N* și se construiește curba etalon folosind cantități diferite de soluție standard diluată (v. tabela 22).

Tabela 22

Construirea curbei etalon pentru determinarea cantitativă a acidului citric după metoda Nateison şi alt.

Reactivi	Eprubeta 1	2	3	4	5	6
Soluţie standard de acid citric (ml)	0,05	0,10	0,15	0,20	0,25	0,30
Acid tricloracetic, soluţie 10%	0,95	0,90	0,85	0,80	0,75	0,70
Probele sînt evaporate pe o baie de ulei sau de $CaCl_2$ pînă la un volum final de 0,4 ml şi apoi sînt răcite						
Reactiv KBr şi apă de brom (ml)	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04
Permanganat de potasiu soluţie 5% (ml)	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
Excesul de permanganat de potasiu este îndepărtat prin tratarea probelor cu apă oxigenată, soluţie 3% (v. textul)						
Eter de petrol (ml)	1,40	1,40	1,40	1,40	1,40	1,40
Eprubetele sînt ermetic închise şi probele sînt extrase 10 minute şi apoi centrifugate la 4 000—5 000 turaţii/minut						
Extractul pentabromacetonei în eter de petrol (ml)	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Soluţie de tiouree (ml)	3,50	3,50	3,50	3,50	3,50	3,50
Probele sînt agitate 5 minute, centrifugate la 4 000/5 000 turaţii/minut şi eterul îndepărtat cu multă atenţie						
Concentraţia acidului citric în probă, exprimată în µg.	5	10	15	20	25	30
Valorile *E* citite la spectrofotometru SF-4, λ=445 mµ.	0,015	0,033	0,050	0,069	0,083	0,100

Calculul rezultatelor. Valorile *E* citite la spectrofotometru pentru fiecare probă sînt folosite pentru calculul rezultatelor, care se realizează după formula:

$$x\,(\text{în mg\%}) = \frac{c \times V_1 \times 100}{V_2 \times g \times 100},$$

unde:

c este cantitatea de acid citric în probă, în µg, citită pe curba etalon;
V_1 — volumul total al amestecului ţesut — acid tricloracetic (în ml);
V_2 — volumul de extract tricloracetic, recoltat pentru analiză (în ml);
g — greutatea probelor de ţesut, recoltate iniţial (exprimată în grame).

BCU MSU / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Exemplu. Pentru obținerea extractului tisular în acid tricloracetic s-au cîntărit 0,42 g țesut; volumul extractului (acid+țesut) a fost de 5 ml; pentru determinarea acidului citric s-au folosit 3 ml de extract tricloracetic. Valoarea *E* pentru proba analizată este 0,050, ceea ce corespunde pe curba etalon la 15 μg de acid citric. Cantitatea de acid citric în țesutul analizat va fi egală cu:

$$x = \frac{15 \times 5 \times 100}{3 \times 0{,}42 \cdot 1\,000} = 5{,}5 \text{ mg\%}.$$

Acidul citric poate fi dozat în țesutul hepatic, muscular, în creier și rinichi. În creier cantitatea de acid citric variază între 4,9 și 7 mg%.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

CAPITOLUL 4

LIPIDE

4.1. NOȚIUNI GENERALE

În compoziția țesuturilor animale și vegetale, pe lîngă proteine și glucide, în cantități relativ mari, se întîlnesc lipidele. Sub denumirea de lipide sînt reunite numeroase substanțe organice care se deosebesc unele de altele din punctul de vedere al compoziției chimice, structurii și proprietăților fizico-chimice. *Lipidele sînt în general compuși organici ușor solubili în solvenții organici* (alcool etilic, alcool metilic, eter sulfuric, acetonă, tetraclorură de carbon, piridină, coloroform, eter de petrol, benzen etc.) *și insolubile în apă*. În lumea vegetală și animală, lipidele se întîlnesc în compoziția tuturor organismelor, îndeplinind diferite funcții fiziologice: lipide structurale, care se întîlnesc în toate celulele vii și lipide de rezervă, depozitate la animale, de regulă, în stratul adipos subcutanat și în unele organe interne, iar la plante, în semințe și fructe.

În protoplasma celulară, lipidele se găsesc nu numai sub formă de incluziuni (picături de grăsime), ci în majoritate sub formă de compuși complecși cu proteinele (instabili). Acești complecși au primit denumirea de lipoproteine.

Lipidele sînt esteri ai alcoolilor (glicerina, sfingozina, inozina) cu acizii grași superiori (acidul stearic, palmitic, oleic etc.) și cu alți componenți (baze azotate, glucide sau derivați și radicali ai acestora, acid fosforic, acid sulfuric etc.).

Spre deosebire de glucide și proteine, lipidele se caracterizează printr-un conținut procentual ridicat de carbon și hidrogen și o valoare nutritivă mai mare, numărul de calorii eliberat prin arderea unui gram de lipide fiind egal cu 9,3 în comparație cu 4,1 calorii, eliberate în cazul arderii unui gram de glucide sau de proteine.

Clasificarea lipidelor — grupă de substanțe eterogenă din punctul de vedere al compoziției chimice și proprietăților fizico-chimice — este dificilă și nu poate ilustra diversitatea structurii și a proprietăților diferitelor componente lipidice, după cum nu reflectă nici specificitatea lipidelor pentru diferite organe. În prezent, diferiți reprezentanți ai acestei clase sînt încă insuficient studiați. De aceea orice clasificare este apriori convențională (fig. 53).

După cum se vede din figura 53, nomenclatura diferiților reprezentanți ai lipidelor nu este definitiv stabilită, de exemplu, sfingofosfolipide,

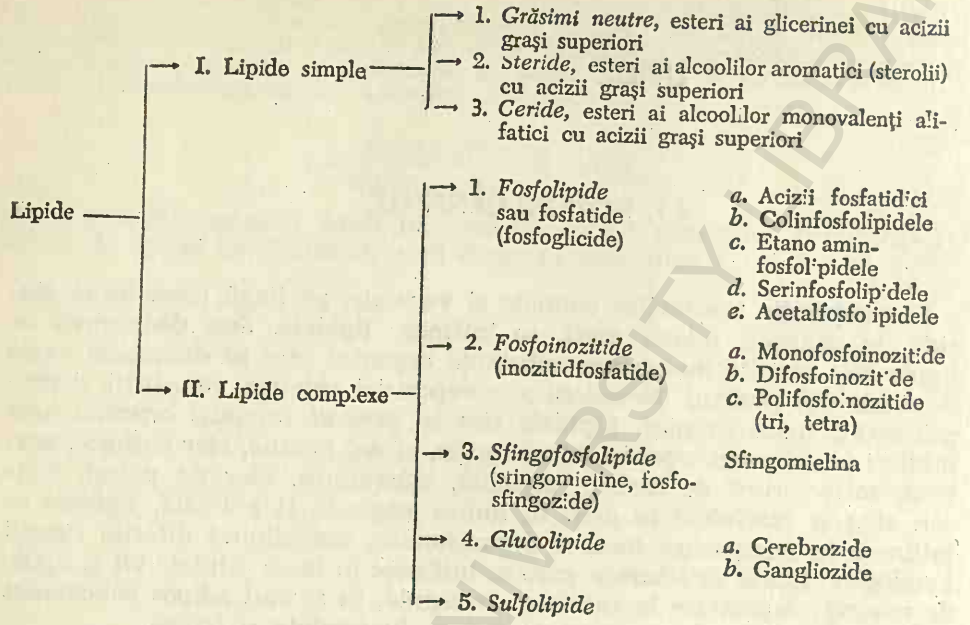


Fig. 53. Clasificarea convenţională a lipidelor.

sfingomieline sau fosfosfingozide. Pentru acetalfosfolipide (acetalfosfatide) nu se cunoaşte definitiv care este formula de structură. În prezent sînt propuse cinci formule de structură, fiecare din acestea tinzînd să exprime proprietăţile fizico-chimice ale acestor fosfolipide.

Lipidele au fost considerate timp îndelungat o clasă de substanţe inertă din punct de vedere metabolic. Cercetările moderne, întreprinse cu ajutorul izotopilor radioactivi, au demonstrat că lipidele participă activ la metabolismul celular şi se refac, după unii autori, la fiecare 5—9 zile, iar după alţii, la aproximativ 70 de zile, în funcţie de natura componentei cercetate şi de starea fiziologică a organismului.

Sub influenţa dereglărilor hormonale, conţinutul procentual al lipidelor şi metabolismul lor în sînge, ficat şi ţesutul adipos se modifică sensibil.

Hiperfuncţia glandei tiroide facilitează utilizarea lipidelor în calitate de substrat energetic. Insulina stimulează biosinteza lipidelor şi, îndeosebi, sinteza acizilor graşi. Un rol important în reglarea metabolismului lipidic îl deţin hipofiza şi glanda suprarenală, unii hormoni, în special, cortizonul, hormonul adenocorticotrop, hormonii glandelor suprarenale, precum şi hormonii lobului posterior al hipofizei.

Explorarea metabolismului lipidic are o deosebită importanţă în clinica medicală pentru diagnosticarea dereglărilor metabolice, care condiţionează apariţia arteriosclerozei şi dezvoltarea stărilor de obezitate.

4.2. ANALIZA CANTITATIVĂ

4.2.1. DETERMINAREA LIPIDELOR ÎN MATERIALUL VEGETAL METODA SOXHLET

Principiul metodei. Lipidele sînt extrase din materialul vegetag cu ajutorul solvenţilor organici şi determinate pe calc gravimetrică după evaporarea extractului la sec.

Reactivi necesari: 1) Tetraclorură de carbon sau eter de petrol (fracţia cu punctul de fierbere cuprins între 40 şi 60°C).

Descrierea aparatului Soxhlet. Aparatul Soxhlet (fig. 54) este compus din trei părţi: balonul termorezistent cu şlif *a*, confecţionat din sticlă Jena sau Pirex, cu o capacitate de 1—1,5 l; extractorul *b* cu şlifuri la ambele extremităţi şi dispozitiv de sifonare şi refrigerentul cu reflux *c* prevăzut cu bule.

Extractorul *b* este prevăzut cu două tuburi laterale de sticlă de diametrul diferit *1*, *2*. Prin intermediul tubului de sticlă *1*, extractorul comunică cu balonul *a* şi cu refrigerentul *c*, iar prin tubul de sticlă *2* comunică exclusiv cu balonul *a*. Vaporii solventului organic, care se formează în timpul extracţiei materialului cînd conţinutul balonului *a* este încălzit, trecînd prin tubul lateral de sticlă *1*, ajung în refrigerent, unde se condensează şi sub formă de picături cad în extractor unde se acumulează. Cînd cantitatea de solvent din extractor, rezultat în urma condensării vaporilor, ajunge la acelaşi nivel cu nivelul solventului din tubul de sticlă *2*, aparatul sifonează, solventul organic ajungînd din nou în balonul *a*.

În timpul determinării lipidelor, în extractorul *b* se introduce cartuşul *d* care conţine materialul de analizat. Cartuşul, sub forma unui cilindru închis la partea inferioară, este confecţionat din hîrtie specială presată. În lipsa cartuşelor standard fabricate special în acest scop se poate confecţiona un cartuş din hîrtie de filtru obişnuită, însă degresată.

După instalarea aparatului Soxhlet sub nişă şi introducerea în tubul extractor a cartuşului care conţine proba de analizat, iar în balonul *a* a solventului, conţinutul balonul *a* se încălzeşte pe o baie de apă în aşa fel încît cantitatea de solvent care se condensează în refrigerentul *c* să nu depăşească 40—60 de picături în 5 minute, adică aparatul să realizeze 10—15 sifonări pe oră.

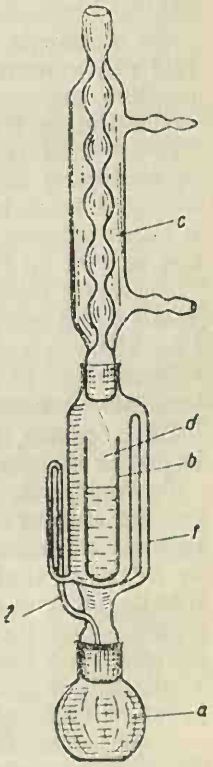


Fig. 54. Aparatul Soxhlet.

Pregătirea materialului pentru analiză. Cartuşul sau hîrtia de filtru utilizată pentru confecţionarea acestuia trebuie degresată în prealabil şi uscată. Se introduce în cartuş, după macerare atentă şi tarare, 5—10 g din materialul de analizat. În cazul cînd materialul de analizat conţine cantităţi mari de lipide, mojararea se realizează în prezenţa nisipului de cuarţ şi se trece cantitativ din mojar în cartuş prin spălarea repetată a mojarului cu cantităţi mici de solvent (10—15 ml pentru fiecare operaţie de spălare).

Folosirea materialului vegetal insuficient uscat pentru dozarea cantitativă a lipidelor este contraindicată, deoarece solvenţii organici în prezenţa unei cantităţi mici de apă extrag din material pe lîngă componentele lipide şi substanţe de altă natură (nelipidice). Cînd uscarea materialului de analizat nu poate fi făcută la sec este necesară deshidratarea acestuia în timpul mojarării. În acest scop, mojararea se face în prezenţa sărurilor care absorb apa sub formă de apă de cristalizare, de exemplu, a sulfatului acid de sodiu. Extracţia materialului se face imediat după prepararec acestuia pentru analiză, păstrarea lui după mojarare fiind de regulă nerecomandabilă.

Se cîntăreşte balonul *a* şi se introduc în acesta o cantitate de solvent (2/3 din volumul balonului) şi cîteva bucăţi de piatră ponce sau tuburi capilare degresate şi închise la una din extremităţi. După introducerea cartuşului în extractor şi instalarea completă a aparatului Soxhlet, inclusiv conectarea refrigerentului la sursa de apă, conţinutul balonului *a* se încălzeşte treptat pe o baie de apă. Pentru evitarea accidentelor este interzisă încălzirea balonului pe o baie de apă deja fierbinte, precum şi o sursă calorică cu flacără, de exemplu, becul de gaz. Încălzirea băii de apă se face cu ajutorul unui reşou electric.

Extracţia lipidelor se realizează cu ajutorul solvenţilor organici în care acestea sînt solubile: eter de petrol, eter etilic, cloroform, amestecuri de eter etilic şi eter de petrol, precum şi tetraclorură de carbon. Ultimul solvent organic este preferat în practica de laborator deoarece pot fi evitate mai uşor accidentele.

În laborator, în timpul funcţionării aparatului Soxhlet, utilizarea becurilor de gaz este interzisă.

În funcţie de cantitatea şi natura materialului de analizat, durata extracţiei variază între 4 şi 12 ore şi se consideră terminată cînd un eşantion recoltat din solventul din cartuş, după evaporare pe o rondelă de hîrtie de filtru, nu lasă urme. În acest scop se opreşte aparatul Soxhlet înainte de a sifona solventul organic acumulat în extractor şi cu ajutorul unei pipete, după încetarea completă a condensării vaporilor în refrigerent şi deconectarea acestuia din ansamblu, se recoltează un volum mic de solvent, care se aplică pe o rondelă de hîrtie de filtru şi se evaporă la temperatura camerei.

După extracţia materialului, solventul din balonul *a* în care se găsesc dizolvate lipidele se distilă, iar balonul este uscat în termostat pînă la obţinerea unei tare constante. Diferenţa dintre greutatea iniţială a balonului şi greutatea finală (cu lipide) reprezintă cantitatea de lipide prezente

în eşantionul de material vegetal analizat. Se calculează cantitatea de lipide prezentă în 100 g de material vegetal şi se exprimă în g%.

Determinarea cantitativă a lipidelor cu ajutorul metodei gravimetrice după extracţia materialului în aparatul Soxhlet cu ajutorul solvenţilor organici prezintă unele deficienţe. Astfel, solvenţii organici frecvent utilizaţi (eter de petrol, eter etilic, tetraclorură de carbon) extrag pe lîngă lipide şi alte substanţe prezente în materialul vegetal în cantităţi mai mari sau mai mici, de exemplu, pigmenţi, uleiuri eterice, vitamine liposolubile etc.

Metoda de extracţie în aparatul Soxhlet este de asemenea întrebuinţată şi pentru analiza materialului de origină animală sau în alte scopuri, de pildă, extracţia pigmenţilor vegetali, extracţia clorofilei cu eter etilic din frunzele uscate ale plantelor superioare şi altele.

4.2.2. DETERMINAREA LIPIDELOR TOTALE ÎN ŢESUTURILE ANIMALE. METODA FOLCH ŞI COLABORATORII. MODIFICATĂ DE I. F. DUMITRU

Principiul metodei. Lipidele totale sînt extrase din ţesuturi cu ajutorul unui amestec de cloroform — alcool metilic. Extractul obţinut este spălat pentru îndepărtarea impurităţilor nelipidice şi a lipidelor totale dozate pe cale gravimetrică.

Reactivi necesari: 1) Cloroform, chimic pur; 2) Alcool metilic, chimic pur.

Obţinerea extractului lipidic şi purificarea lui. Probele de ţesut (200—250 mg, în cazul ţesutului cerebral şi 300—400 mg, pentru ţesutul hepatic) se recoltează într-un mojar, unde se triturează în prezenţa nisipului de cuarţ, trecîndu-se apoi cantitativ cu ajutorul amestecului de cloroform — alcool metilic (în proporţie de 2 : 1) în baloane cotate de 25 ml. Volumul de cloroform — alcool metilic utilizat pentru această operaţie nu trebuie să depăşească 15 ml. Conţinutul balonului se agită energic în decurs de 10 minute, apoi se aduce la semn cu amestec de cloroform — alcool metilic 2 : 1, din nou se agită, şi după 10 minute de extracţie, conţinutul balonului se filtrează cît mai repede posibil, evitîndu-se evaporarea amestecului de solvenţi.

Îndepărtarea impurităţilor nelipidice şi acvosolubile se realizează prin spălarea extractului lipidic cu apă distilată. În acest scop, într-un pahar Hagedorn (V=25 ml) se pun cu pipeta 10 ml de apă distilată şi apoi încet şi atent, evitîndu-se agitarea violentă şi amestecul celor două lichide, se introduc cu pipeta sub stratul de apă 10 ml de extract lipidic.

Paharul Hagedorn este introdus ulterior într-un pahar Berzelius care conţine 400—500 ml apă distilată. Paharul Berzelius se acoperă cu o placă de sticlă şi se lasă în repaus timp de 24 de ore. După această pe-

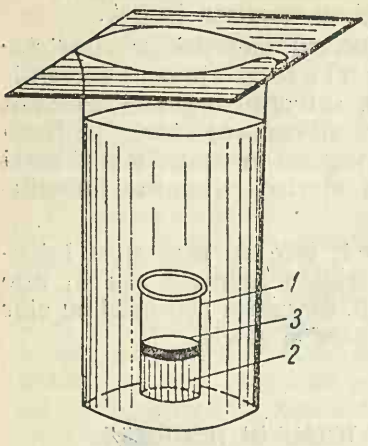


Fig. 55.

rioadă de timp, în paharul Hagedorn se pot observa trei faze distincte (fig. 55):

— faza superioară (*1*), limpede, apă — alcool metilic, se găsește în contact direct cu apa din paharul Berzelius;

— faza inferioară cloroformică (*3*), puternic opalescentă;

— la limitele de separare a celor două faze, o peliculă albă (*2*), densă și unitară care conține lipide și proteolipide.

Uscarea extractului și dozarea gravimetrică a lipidelor. Paharul Hagedorn este scos din paharul Berzelius și faza superioară se îndepărtează prin sifonare, evitîndu-se distrugerea peliculei, în care scop, deasupra acesteia se lasă un strat de lichid gros de 2—3 mm. În paharul Hagedorn se adaugă cu o pipetă apoi 3—5 ml de alcool metilic pur pentru dizolvarea peliculei de lipide și conținutul paharului se agită. În cazul cînd pelicula lipidică nu se dizolvă complet se adaugă alcool metilic, picătură cu picătură, pînă cînd soluția devine perfect transparentă.

După dizolvarea completă a peliculei lipidice conținutul paharului Hagedorn se trece cantitativ, prin spălări repetate cu cantități mici de alcool metilic (0,5—1 ml), într-o fiolă de cîntărire.

Uscarea extractului lipidic se efectuează mai întîi la temperatura camerei, timp de 24 de ore, iar apoi în termostat, la temperatura de 50—60°C. Extractul se usucă pînă la obținerea, prin cîntărirea repetată a fiolei, a unei tare constante. Făcînd diferența dintre greutatea fiolei tratate cu și fără precipitat lipidic *a* și ținînd seama de cantitatea de țesut luată pentru dozarea lipidelor *b*, de cantitatea de extract lipidic utilizată inițial pentru purificare prin spălare *c*, precum și de volumul inițial (total) al extractului *d* se calculează cantitatea de lipide totale din țesut și se exprimă în gram-procente, introducînd valorile de mai sus în formula:

$$g\%\ \text{lipide totale} = \frac{a \times d \times 100}{b \times c}.$$

Eroarea metodei prezentate mai sus este în medie de 2—3%. Metoda Folch, în modificarea descrisă, este rapidă și comodă, premițînd dozarea fracției lipidelor totale în ficat, creier, splină, inimă, mușchi etc. Pe lîngă fracția lipidelor totale sînt extrase și proteolipidele a căror cantitate în extract este însă neglijabilă (0,1%) în comparație cu concentrația lipidelor totale (10,5—11%, în țesutul cerebral și 4,8—5,2%, în țesutul hepatic).

4.2.3. DETERMINAREA FOSFOLIPIDELOR

4.2.3.1. Metoda Vladimirov și colaboratorii

Principiul metodei. Fosfolipidele sînt extrase din materialul de analizat cu diferite amestecuri de solvenți organici și determinate cantitativ după conținutul procentual al fosforului lipidic.

Reactivi necesari: 1) Acid tricloracetic, soluție 5%; 2) Alcool etilic, absolut; 3) Eter sulfuric, p.a.; 4) Cloroform, proaspăt distilat; 5) Alcool metilic, p.a.; 6) Reactivi pentru dozarea fosforului după Fiske — Subbarov.

Modul de lucru. *Extracția fosfolipidelor* se face după metoda Vladimirov și colaboratorii, care se bazează pe tratarea repetată a omogenatului tisular cu acid tricloracetic în scopul îndepărtării fosforului acidosolubil și anorganic.

Probe paralele de țesut, egale cu 1 g în cazul creierului și 0,5 g pentru țesutul muscular, sînt macerate în mojar în prezența nisipului de cuarț și a 10 ml de CCl_3COOH, soluție 5%, răcită la 0°C. Probele sînt centrifugate la 7 000—8 000 turații/minut și partea alicotă (extractul tricloracetic) este decantată. În continuare, probele sînt spălate cu soluție răcită de acid tricloracetic, 5 ml soluție 2,5% pentru fiecare gram de țesut. Operația de tratare cu acid tricloracetic se repetă de 10—12 ori în scopul extragerii materialului acidosolubil și supernatantele sînt de fiecare dată decantate atent. Urmele de acid tricloracetic sînt îndepărtate din materialul rezidual, prin spălarea acestuia cu apă distilată rece (la 0°C). Cele 8—10 spălări sînt însoțite de agitarea energică a precipitatului înainte de centrifugare.

După completa îndepărtare a urmelor de CCl_3COOH din precipitatul tisular, ultimul este tratat cu 5 ml de acetonă/g de țesut și ulterior cu eter etilic. Solvenții organici (acetona și eterul etilic), după centrifugarea probelor, sînt colectați într-un balon cotat de 150 ml.

Extracția fosfolipidelor se realizează în două etape consecutive și cu amestecuri diferite de solvenți organici. În prima etapă, precipitatul tisular este extras cu 10 ml amestec alcool etilic — eter sulfuric 3 : 1 (vol/vol) proaspăt preparat și la temperatura de 60°C, timp de 3 minute. Probele sînt centrifugate imediat în tuburi de centrifugă cu o capacitate de 50 ml, și partea alicotă colectată în balonul cotat care conține extractul acetonic și eteric. În etapa a doua, extracția se realizează, cu ajutorul a 30 ml de amestec cloroform — alcool metilic (1 : 1 vol/vol), la 64°C, timp de 30 minute.

După centrifugarea probelor, partea alicotă este colectată în balonul cotat și volumul acestuia se aduce la semn cu eter etilic. Extractul fosfolipidic este imediat analizat, separat sau dozat, deoarece în timpul conservării au loc procese de oxidare, chiar și la temperaturi scăzute.

Determinarea fosfolipidelor. Din extractul fosfolipidic se iau două probe (a 2 ml fiecare) pentru determinarea fosforului fosfolipidic. În acest

scop se recomandă utilizarea eprubetelor termorezistente din sticlă Jena sau Pirex, care sînt rezistente și la acțiunea acizilor minerali concentrați.

Probele sînt evaporate la sec pe o baie de apă și mineralizate pe o baie de nisip timp de 10—11 ore pînă la completa decolorare. Pentru mineralizare se utilizează un amestec de 0,5 ml H_2SO_4 concentrat și 0,1 ml HNO_3.

Fosforul este dozat în probe după metoda colorimetrică Fiske-Subbarov, valorile *E* pentru fiecare probă fiind folosite pentru calcularea fosforului după citirea extincției pe curba etalon. Curba etalon se construiește cu ajutorul unei soluții standard de KH_2PO_4 care conține 20 μg P într-un ml de soluție.

Se calculează cantitatea de fosfor lipidic corespunzătoare la 1 g de țesut și se exprimă în mg. Pentru calcularea fracției fosfolipidice rezultatul se înmulțește cu 25[1].

4.2.3.2. Metoda I. F. Dumitru

Principiul metodei. Extractul fosfolipidic obținut din țesutul analizat este evaporat la sec, dizolvat în cloroform pur și introdus într-o coloană de silicagel. Fosfolipidele adsorbite pe coloana de silicagel sînt eluate cu amestecuri de cloroform și metanol în diferite proporții și volume. Eluate de 5—10 ml sînt colectate în eprubete și fosforul fosfolipidic determinat după metoda Fiske și Subbarov. După repartiția fosforului și reacții calitative specifice se determină zonele de repartizare a diferitelor componente fosfolipidice.

Reactivi necesari: 1) Silicagel, 80—100 mesh; 2) Cloroform proaspăt distilat; 3) Alcool metilic; 4) Reactivi pentru determinarea fosforului; 5) Ninhidrină, soluție 1%; 6) Rodamin-G, soluție 2% în alcool; 7) Rodamin B-extra; 8) Acid fosfomolibdenic, soluție 2%.

Modul de lucru. Extractul fosfolipidic obținut dintr-un gram de țesut cerebral sau hepatic este evaporat la sec pe o baie de apă la temperatura de 60—62°C și apoi într-o etuvă-termostat reglabilă la 65° și prevăzută cu instalație de vacuum. Evaporarea extractului la o temperatură mai ridicată și în condiții necorespunzătoare favorizează desfășurarea proceselor de degradare a fosfolipidelor și alterarea acestora. Reziduul este dizolvat în 10 ml cloroform pur și introdus într-o coloană de silicagel preparată cu 1—2½ ore înainte de începerea experienței. Este absolut necesar ca silicagelul să fie suficient de bine sedimentat, iar deasupra lui, în momentul introducerii fosfolipidelor, să se găsească un strat de cloroform gros de 1—2 cm.

---

[1] Cantitatea fosfolipidelor în țesutul analizat se exprimă în g% lecitină. Deoarece s-a dozat fosforul lipidic se calculează coeficientul de calcul, ținînd seama de faptul că greutatea moleculară a lecitinei este în medie de 776 și în molecula ei se găsește un singur atom de fosfor — 776/31=25.

Pregătirea coloanei de silicagel. În scopul separării fosfolipidelor pot fi utilizate preparate românești de silicagel nr. 11, cu foarte bune rezultate, precum și acid silicic amestecat în proporții definite cu pămînt de infuzorii. Coloana constă dintr-un tub de sticlă (2,5×25 cm) dotat cu un filtru de sticlă la partea inferioară și cu un rezervor pentru amestecul de solvenți, cu o capacitate de 750 ml. Silicagelul special preparat pentru cromatografie, marca ICECHIM, este macerat pînă la obținerea unei pulberi cu o granulație de 80—100 mesh. După eliminarea impurităților din silicagel prin spălarea repetată cu solvenți organici (hexan, eter de petrol, metanol, cloroform), este uscat la temperatura camerei, iar apoi activat prin încălzire la 105°C, timp de 20—24 de ore, în termostat. Cînd preparatul de silicagel conține urme de fier este necesară spălarea lui cu acid clorhidric, soluție 1 *N*, apoi cu apă și în final cu solvenți organici. Înainte de introducerea silicagelului în coloană, pe discul de sticlă perforat se montează o bucată circulară de hîrtie de filtru și deasupra acesteia se așază vată de sticlă într-un strat gros de 3 cm. Silicagelul se amestecă bine cu primul solvent care va fi utilizat — cloroformul — și se introduce în coloana cromatografică. Este absolut necesar ca coloana de silicagel să fie compactă și să nu conțină bule de aer; repartiția omogenă a silicagelului în coloană și gradul de stabilitate al acesteia sînt condiții necesare pentru o bună fracționare a fosfolipidelor.

Solvenții utilizați pentru eluția componentelor fosfolipidice din coloana astfel preparată trebuie să fie proaspăt distincți pentru îndepărtarea totală a urmelor de apă, alcool etilic etc.

Soluția de fosfolipide, care conține de la 1,8 la 4,5 mg de fosfor, este introdusă cu grijă în coloană, evitîndu-se agitarea suprafeței silicagelului sau obținerea unei suspensii a silicagelului în soluția nou-adăugată. Formarea foselor este contraindicată și, în cazul apariției lor experiența se reface. După adsorbția extractului fosfolipidic pe straturile superioare ale silicagelului, coloana se conectează la un colector automat de fracții și procesul eluției fosfolipidelor din coloană durează 15—18 ore.

Stabilitatea coloanei se asigură prin folosirea rezervorului pentru solvenți (cu o capacitate de 750 ml) și schimbarea solventului în rezervor se efectuează automat, amestecurile de cloroform-alcool metilic fiind preparate cu ajutorul unui agitator magnetic. Extremitatea superioară a rezervorului se pune în contact cu un tub de azot pentru a asigura o presiune constantă deasupra amestecului de solvenți din rezervor și totodată o viteză de eluție egală cu 2 ml pe minut. Se colectează probe de cîte 10 ml fiecare.

Metoda de separare a fosfolipidelor după Vladimirov și colaboratorii prezintă dezavantajul că în extractul fosfolipidic, colesterolul din țesutul cerebral sau din ficat este prezent în cantități masive. De aceea este necesară îndepărtarea acestuia din extractul fosfolipidic adsorbit pe coloana de silicagel. În acest scop se folosesc pentru eluția coloanei apro-

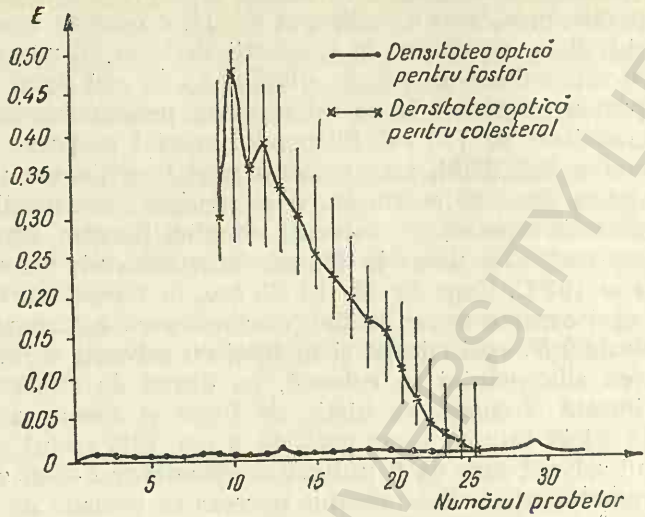


Fig. 56. Curba de eluție a colesterolului din extractul fosfolipidic obținut din creier și adsorbit pe coloană de silicagel (după I. F. Dumitru, 1962).

ximativ 250—400 ml de cloroform pur. Colesterolul s-a identificat cu ajutorul reacției de culoare Lieberman-Burchard. Această cantitate de cloroform este suficientă pentru eluția completă a colesterolului (fig. 56). Coloana este eluată în continuare cu amestec de cloroform-alcool metilic 4 : 1 (500 ml), cloroform-alcool metilic 3 : 2 500 ml și cloroform-alcool metilic, 1 : 4 (500 ml). În funcție de cantitatea inițială de țesut recoltată pentru extragerea fosfolipidelor și corespunzător valorii fosforului fosfolipidic din extractul utilizat, cantitățile de solvent pot varia de la 1 la 2 l, volum total. Micșorînd volumul solvenților utilizați este necesar să se colecteze probe de 15 ml și viteza de eluție a coloanei să fie redusă la 1—1,5 ml/min.

In timpul eluării coloanei, eluatele sînt verificate, identificîndu-se prin reacții de culoare componentele fosfolipidice prezente în fracțiile respective. Reacțiile de culoare ale diferitelor fosfolipide cu ninhidrina, Rodamina-G, Rodamina B-extra și acidul fosfomolibdenic sînt redate în tabela 23.

După eluarea coloanei cu volumul corespunzător de solvenți, probele sînt evaporate la sec pe o baie de apă și sub nișă și în fiecare se dozează fosforul anorganic rezultat după mineralizarea eluatelor. Se construiește curba de repartizare a diferiților componenți fosfolipidici, ținîndu-se seama de numărul de ordine al eluatului și de concentrația fosforului. În fi-

BCU CLUJ UNIVERSITY LIBRARY

Tabela 23

Reacţiile de culoare specifice pentru diferite componente fosfolipidice[1] (după I. F. Dumitru 1962)

Fracţia	Componentul fosfolipidic identificat[2]	Reactivii			
		Ninhidrina	Rodamin G	Rodamin B-extra	Acid fosfomolibdenic
1	Acizi fosfatidici (I)	—	Spoturi colorate în violet	Spoturi colorate în albastru	—
2	Etanolaminfosfatide (II)	Spoturi de culoare roşie-purpurie	Spoturi colorate în violet	Spoturi colorate în galben-portocaliu	—
3	Serinfosfatide şi inozinfosfatide (III)	Spoturi colorate în roşu-purpur	—	Spoturi colorate în albastru pe margine şi uşor portocaliu în centru	Spoturi colorate în albastru
4	Colinfosfatide (IV)	—	Spoturi colorate în galben-portocaliu	—	Spoturi colorate în albastru
5	Sfingofosfatide (V)	—	Spoturi colorate în galben-portocaliu	Spoturi colorate în galben-portocaliu	Spoturi colorate în albastru

[1] Eluatele fosfolipidice sînt aplicate în volume mici (0,2—0,3 ml) pe litru de filtru, uscate la temperatura camerei şi introduse în soluţia colorantului dorit. Se usucă din nou la temperatura de 20—22°C şi se examinează în lumină ultravioletă.

[2] Curba de reparaţii a fosforului fiecărei fracţii fosfolipidice este redată în figura 57,*a* şi *b*.

gura 57 sînt redate două curbe de repartiţie a componentelor fosfolipidice extrase dintr-un gram de ţesut cerebral, folosindu-se şi eluţia prealabilă a coloanei cu cloroform.

Se calculează conţinutul fosforului pentru fiecare fracţie fosfolipidică şi se exprimă în procente faţă de totalul de fosfor iniţial utilizat pentru separarea fosfolipidelor pe coloană (tabela 24). Se calculează randamentul metodei, care, de regulă, este de $96 \pm 2{,}8\%$ (tabela 25).

Metoda de separare a fosfolipidelor pe coloană de silicagel este frecvent utilizată pentru explorarea funcţională a diferitelor organe, precum

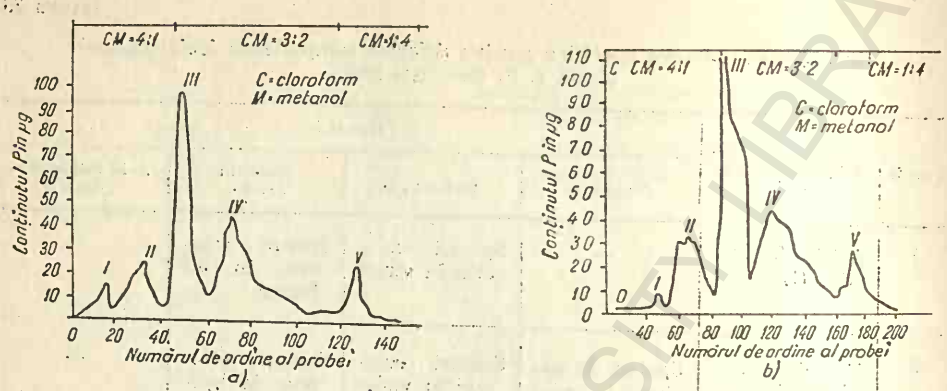


Fig. 57. *a* — Curba repartiției componenților fosfolipidici din creier, obținută după cromatografia extractului fosfolipidic (1 g țesut cerebral):

a — Curba repartiției componenților fosfolipidici din creier, obținută după cromatografia extractului fosfolipidic (1 g țesut cerebral); *b* — separarea componenților fosfolipidici din creier după eluția extractului din coloană cu cloroform, pentru îndepărtarea colesterolului (după I. F. Dumitru, 1962).

și pentru obținerea de preparate fosfolipidice necesare industriei ușoare, de exemplu, fosfolipidele din soia sînt larg folosite în loboratoarele de cofetărie. Cromatografia pe coloană a fost intens utilizată pentru studiul compoziției chimice a lipidelor din numeroase organe animale și vegetale și s-a dovedit rodnică în domeniul stabilirii structurii chimice a componentelor fosfolipidice.

Tabela 24

Corelațiile cantitative ale fracțiilor fosfolipidice din creier, exprimate în procente față de fosforul fosfolipidic total (după I. F. Dumitru 1962)

Experiența nr	Fracția				
	I	II	III	IV	V
1	3,0	26,4	24,4	44	3,8
2	1,5	21,0	24,8	46	7,1
3	2,0	19,5	28,4	44,5	5,8
4	2,0	23,3	24,0	47	4,1
5	2,4	18,8	28,0	39	5,0
6	2,3	19,5	20,6	44,3	13,0
7	1,0	20,0	26,0	46	8,0
8	4,1	21,9	24,0	44	6,0
9	2,1	18,1	18,0	50	12,0
10	2,0	19,0	16,0	44	9,0
11	1,8	19,0	22,0	48	11,0
12	1,3	19,1	23,0	45,5	12,0
Valorile medii	2,1	20,4	23,0	45	7,2

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

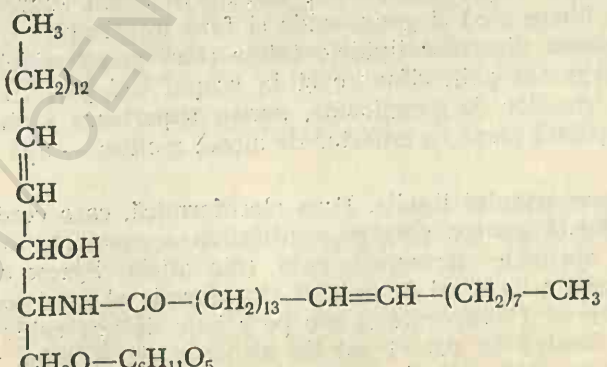
Tabela 25

Cantitatea fosforului lipidic (exprimată în %) eluat din coloana de silicagel după cromatografia extractului fosfolipidic din creierul de șobolan (după I. F. Dumitru 1962)

Experiența nr.	Cantitatea de fosfor fosfolipidic absorbit pe coloană	Cantitatea de fo for fosfolipidic eluat din co.oană	Randamentul metodei %
1	3,832	3,759	97
2	2,125	1,913	90
3	1,638	1,631	96,6
4	1,375	1,347	98
5	2,000	1,823	91
6	4,600	4,500	98
7	4,450	4,365	98
8	2,200	2,250	102,0
9	3,500	3,100	91,5
10	2,010	1,912	96,0
11	1,850	1,800	97,5
			96±2,8%

4.2.4. DETERMINAREA CEREBROZIDELOR METODA SVENNERHOLM-TARANOVA

Cerebrozidele (1) sînt substanțe organice în compoziția cărora se întîlnesc sfingozina, un acid gras superior nesaturat și o componentă glucidică, de obicei, galactoza. Datorită prezenței în molecula lor a galactozei, cerebrozidele sînt denumite și galactolipide sau galactozide. Separate din țesutul nervos în care se găsesc în cantități relativ mari, cerebrozidele pot fi obținute în stare cristalină sau amorfă. Ele sînt solubile în acid acetic, cloroform, amestec de cloroform-alcool metilic, piridină etc. și insolubile în apă, eter etilic, alcool etilic, la rece etc. Datorită faptului că posedă un atom de carbon asimetric, cerebrozidele sînt substanțe optic active.



(1)

Fig. 58. Nervona.

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Principiul metodei. **Lipidele tisulare sînt extrase cu amestec de alcool etilic — eter etilic şi din extractul lipidic sînt îndepărtate gangliozidele şi impurităţile de natură nelipidică. Reziduul este hidrolizat şi galactoza dozată cantitativ prin reacţia cu orcină. Cerebrozidele sînt dozate indirect prin determinarea cantitativă a galactozei.**

Reactivi necesari: 1) Acid sulfuric, concentrat şi soluţie 3N; 2) Clorură de sodiu, soluţie 0,1%; 3) Alcool etilic; 4) Alcool metilic; 5) Eter etilic; 6) Cloroform; 7) Amestec alcool etilic — eter etilic 3 : 1; 8) Galactoză pură; 9) Orcină, soluţie 0,2%, preparată în acid sulfuric concentrat.

Modul de lucru

Extragerea cerebrozidelor din ţesutul nervos. Şobolanii albi, în greutate de 120—140 g, sînt decapitaţi cu ajutorul unei ghilotine şi emisferele cerebrale sînt recoltate rapid prin deschiderea cutiei craniene şi omogenizate timp de 2—5 minute într-un omogenizator de sticlă acţionat de un micromotor. Omogenatul emisferelor cerebrale este trecut pe o sticlă de ceas, cîntărit şi uscat, pînă la obţinerea unei tare constante, în exicator, sub vacuum (1—2 mm Hg), în prezenţa acidului sulfuric concentrat. De regulă, operaţia de deshidratare a omogenatului durează 2—3 zile. Din materialul uscat se recoltează 2 probe a 200 mg, care se introduc în cartuşe Soxhlet, prealabil degrasate cu amestec alcool etilic — eter etilic 3 : 1, şi materialul de analizat este extras cu ajutorul unei instalaţii de microsoxhlet şi a unui amestec de cloroform — alcool metilic 1 : 2, în decurs de 2 ore. Extractul cloroform — alcool metilic al omogenatului, care conţine lipide, este filtrat într-un cilindru gradat prevăzut cu dop rodat. La filtrat se adaugă soluţie de clorură de sodiu 0,1%, respectîndu-se proporţia 0,25 ml NaCl pentru 1 ml de filtrat. Cilindrul este închis ermetic şi conţinutul lui agitat timp de 2—3 minute. Soluţia se lasă în repaus timp de 48 de ore, la 0°C, de regulă, în frigider. În acest timp are loc separarea amestecului în două faze distincte: faza superioară — alcool metilic — apă, care conţine clorură de sodiu, ingrediente nelipidice (glucide libere etc.) şi gangliozide şi faza inferioară — cloroformică, în care se găsesc dizolvate lipidele totale (fără gangliozide). Faza superioară este separată prin sifonare şi în scopul îndepărtării substanţelor nelipidice şi urmelor de gangliozide, partea superioară a stratului cloroformic este spălată atent cu amestec de alcool metilic — apă — cloroform (47 : 48 : 3).

Hidroliza preparatului lipidic. Faza cloroformică, care conţine cerebrozide, este folosită pentru dozarea cantitativă a acestora, după hidroliza lipidelor. În eprubete termorezistente (din sticlă Pyrex sau Jena) se recoltează probe a 2—4 ml de extract cloroformic al lipidelor din ţesutul nervos. Probele sînt evaporate la sec pe o baie de apă caldă şi sub nişă. Reziduul se dizolvă în 0,5—1 ml de alcool etilic şi apoi la soluţie se adaugă 2 ml de acid sulfuric, soluţie 3*N*. Probele sînt hidrolizate timp

de 2 ore pe o baie de apă fierbinte și cu ajutorul unei instalații prevăzute cu refrigerent cu reflux. Probele sînt încălzite după îndepărtarea refrigerentului cu reflux timp de 10 minute. După hidroliză probele sînt filtrate (filtrul de hîrtie trebuie spălat în prealabil cu soluție de acid sulfuric 3*N* pentru îndepărtarea impurităților) în cilindri gradați, prevăzuți cu dopuri rodate și volumul hidrolizatului se aduce la 10 ml cu apă distilată.

Determinarea galactozei în hidrolizatul lipidic. Din hidrolizatul lipidelor totale se recoltează 2 probe a 2 ml hidrolizat care se introduc într-o eprubetă cu dop rodat. Probele sînt răcite cu gheață și apoi se adaugă încet, picătură cu picătură, 4 ml de soluție de orcină 0,2%, evitîndu-se amestecarea reactivului cu proba de hidrolizat. După 5 minute de la adăugarea reactivului de orcină, probele sînt ușor agitate în scopul realizării amestecului dintre hidrolizat și orcină și sînt din nou introduse în baia de gheață pentru 15 minute. Ulterior, probele sînt trecute într-o baie de apă la 80°C, timp de 20 de minute și apoi răcite. Galactoza, în prezența orcinei, dezvoltă o coloratie roșie cu un maximum de absorbție la 500 mμ. Citirea probelor la spectrofotocolorimetru se realizează utilizîndu-se o probă martor care conține 4 ml soluție de orcină și 2 ml de apă distilată.

Calculul rezultatelor. Cantitatea de galactoză în proba analizată se determină folosindu-se valoarea *E* și o curbă standard realizată cu galactoză pură. În cerebrozide galactoza formează 22,2%, deci pentru determinarea cantitativă a acestora, cantitatea de galactoză din probă trebuie înmulțită cu coeficientul de transformare 4,55.

Exemplu de calcul. Fie *E* egal cu 0,20, ceea ce corespunde pe curba etalon la 19 μg de galactoză. Cantitatea de cerebrozide va fi egală cu $19 \times 4{,}55 = 86{,}45$ μg. Dacă pentru hidroliză s-au recoltat 4 ml de extract cloroformic, iar din 10 ml de hidrolizat s-au luat 2 ml pentru dozarea galactozei și extractul lipidic s-a realizat din 200 mg de omogenat, atunci cantitatea de cerebrozide în țesutul nervos calculată în mg% va fi egală cu:

$$\frac{19 \times 4{,}55 \times 10 \times 10 \times 100}{4 \times 2 \times 200 \times 1\,000} = 5{,}40 \text{ mg\%}.$$

Greutatea uscată a țesutului nervos formează aproximativ 20—21% din greutatea umedă, deci cantitatea de cerebrozide în țesutul nervos va fi egală cu:

$$\frac{20{,}5 \times 5{,}40}{100} = 1{,}06 \text{ mg\%}.$$

4.2.5. DETERMINAREA INDICELUI DE IOD. METODA HÜBL

În componența lipidelor și îndeosebi a uleiurilor vegetale, pe lîngă acizii grași saturați se găsesc în cantități apreciabile și acizii grași nesaturați, ca acidul oleic (1), linolic (2), linolenic (3) etc., care datorită prezenței

în molecula lor a dublei sau dublelor legături sînt capabili să adiționeze halogeni (5):

$$CH_3—(CH_2)_7—CH=CH—(CH_2)_7—COOH \quad (1)$$

$$CH_3—(CH_2)_4—CH=CH—CH_2—CH=CH—(CH_2)_7—COOH \quad (2)$$

$$CH_3—CH_2—CH=CH—CH_2—CH=CH—CH_2—CH=CH—(CH_2)_7—COOH. \quad (3)$$

In literatură sînt descrise cîteva metode de determinare a indicelui de iod, care se deosebesc prin natura halogenului utilizat și a solventului în care soluția acestuia este preparată. În principalele metode se folosesc soluții de ICl în alcool, ICl în acid acetic glacial, IBr în acid acetic glacial, iod în alcool etilic și soluții de NaBr și Br_2 în alcool metilic absolut. Indiferent de natura compusului halogenat care se folosește, cantitatea de halogen adiționat de 100 g de grăsime se calculează în cantități echivalente de iod și se exprimă în grame de iod.

Principiul metodei. Biclorura de mercur în prezența iodului se descompune cu formare de monocloruri de iod (4):

$$HgCl_2+2I_2=HgI_2+2ICl. \quad (4)$$

Iodul din monoclorura de iod este adiționat la dubla legătură a acizilor grași nesaturați (5):

$$CH_3—(CH_2)_7—CH=CH—(CH_2)_7—COOH+2ICl \longrightarrow$$

$$CH_3—(CH_2)_7—CHI—CHI—(CH_2)_7—COOH+Cl_2. \quad (5)$$

În momentul adăugării ulterioare a iodurii de potasiu, după ce probele au stat la întuneric timp de 2 ore, între aceasta și excesul de ICl are loc următoarea reacție cu eliberare de iod (6):

$$ICl+KI=KCl+I_2. \quad (6)$$

Iodul rezultat se dozează cu o soluție titrată de tiosulfat de sodiu (7):

$$I_2+2Na_2S_2O_3=Na_2S_4O_6+2NaI. \quad (7)$$

Reacția de adiție a halogenului în cazul compușilor în a căror structură se întîlnesc două, trei sau mai multe duble legături decurge în mod analog cu cazul descris mai sus pentru acidul oleic (5), însă nu este întotdeauna strict cantitativă, fiind în funcție de caracterul și configurația spațială a dublelor legături. Astfel, izomerul acidului linolenic, acidul eleostearic, în structura căruia se găsesc tot trei duble legături, în condiții experimentale identice adiționează halogenul, saturîndu-se numai la două duble legături. Această comportare poate fi explicată de configurația spațială a dublelor legături, care în acest caz sînt conjugate, ceea ce nu se poate spune despre acidul linolenic. Un caz asemănător se întîl-

neşte şi pentru izomerii acidului oleic în a căror structură chimică, dubla legătură se găseşte în apropierea grupării carboxil şi nu între atomii de carbon 9 şi 10.

Indicele de iod reprezintă cantitatea de iod, exprimată în grame, care este adiţionată de 100 grame de substanţă grasă. Pentru determinarea indicelui de iod există mai multe metode: Kaufman, Hanus, Hübl etc. Se va descrie mai jos metoda lui Hübl utilizată curent în industrie pentru determinarea indicelui de iod în grăsimi, uleiuri vegetale şi semifabricate.

Reactivi necesari: 1) Cloroform, p.a.; 2) Iod în iodură de potasiu, soluţie 5%, preparată în alcool 95°; 3) Clorură de mercur soluţie 6% în alcool 95°; 4) Iodură de potasiu, soluţie 20% în alcool; 5) Tiosulfat de sodiu, soluţie *N*/10; 6) Amidon, soluţie 1%, preparată în apă distilată.

Modul de lucru. În două baloane Erlenmeyer, curate şi perfect uscate, prevăzute cu dop rodat, se cîntăresc la balanţa analitică două eşantioane a cîte 0,3—0,5 g material de analiză (grăsime animală sau ulei vegetal). Se măsoară cu pipeta în fiecare probă cîte 15 ml de cloroform, 20 ml soluţie de iod 5% şi 20 ml soluţie de $HgCl_2$ 6%. Amestecul este energic agitat. Cînd probele sînt opalescente şi după adiţionarea soluţiei de iod, este necesară adăugarea de cloroform pînă la obţinerea unei soluţii perfect clare. Proba martor constă din reactivii mai sus utilizaţi, fără eşantionul materialului analizat.

Baloanele se închid ermetic, conţinutul lor se agită energic şi se lasă în repaus la întuneric 2 ore, după care în fiecare se adaugă 25 ml soluţie de iodură de potasiu 20%. Excesul de iod se titrează cu tiosulfat de sodiu pînă la apariţia unei colorăţii galbene-portocalii. Se adaugă apoi 2—3 picături soluţie de amidon 1% şi probele sînt titrate cu soluţie de $Na_2S_2O_3$ *N*/10 pînă la dispariţia completă a colorăţiei albastre.

Titrul soluţiei de $Na_2S_2O_3$ N/10 se stabileşte cu ajutorul bicromatului de potasiu. Într-un litru de apă distilată se dizolvă 3,866 g de bicromat de potasiu. Într-un balon Erlenmeyer se iau 20 ml soluţie de bicromat de potasiu, 10 ml soluţie de KI 10% (fără urme de iodat), 5 ml HCl concentrat şi 100 ml de apă distilată. Iodul rezultat este titrat cu soluţie de $Na_2S_2O_3$ *N*/10. La 1 ml de soluţie de tiosulfat de sodiu corespund la 0,0127 g de iod (reacţiile 7; 8):

$$K_2Cr_2O_7+6KI+14HCl=8KCl+Cr_2Cl_6+7H_2O+3I_2. \qquad (8)$$

Calculul rezultatelor. Indicele de iod se calculează după formula:

$$\frac{v-v_1}{P}\times 0{,}0127\times 100=\text{g } I_2/100 \text{ g substanţă grasă},$$

unde:

v este volumul soluţiei de tiosulfat de sodiu utilizat pentru titrarea probei martor;

v_1 — volumul de soluţie $Na_2S_2O_3$, exprimat în ml, necesar pentru titrarea probei cu substanţă (media a cel puţin două titrări);

P — cantitatea de material (grăsime animală sau ulei vegetal) folosită pentru analiză și exprimată în grame;

0,0127 — coeficientul de echivalență. Indicele de iod se exprimă în grame de I_2 adiționate de 100 g de material de analizat și este în funcție de gradul de nesaturare al acizilor grași prezenți în grăsimea sau uleiul analizat.

Exemplu de calcul. Pentru titrarea probei martor s-au folosit 17,7 ml soluție de $Na_2S_2O_3$ $N/10$, iar pentru probele cu materialul analizat, 14,70 ml și respectiv 14,60 ml tiosulfat de sodiu $N/10$, al cărui factor (f) este de 1,03. Pentru 1 g de material analizat s-au consumat:

$(17{,}7-14{,}65)\times 1{,}03\times 0{,}0126=0{,}03956$ g I_2, și indicele de iod va fi egal cu 3,96 g I_2/100 g substanță grasă.

Importanța practică. Indicele de iod se utilizează curent în industria ușoară și alimentară pentru aprecierea naturii și purității grăsimilor și uleiului. Este folosit de asemenea pentru calcularea cantității de hidrogen necesară hidrogenării acizilor grași nesaturați prezenți în uleiuri, în cazul cînd păstrarea sau transportul acestora reclamă solidificarea.

Observații. Pentru conservarea soluției de amidon în condiții de laborator se recomandă prepararea acesteia în soluție de clorură de sodiu. Pentru determinarea indicelui de iod, acest procedeu este contraindicat, deoarece halogenul (Cl din NaCl) poate participa activ la saturarea dublelor legături prezente în compoziția acizilor grași nesaturați.

4.2.6. DETERMINAREA INDICELUI DE SAPONIFICARE

Indicele de saponificare reprezintă cantitatea de hidroxid de potasiu, exprimată în miligrame, necesară pentru saponificarea gliceridelor și neutralizarea acizilor grași liberi prezenți într-un gram de grăsime sau de ulei vegetal:

$$\begin{array}{l} CH_2OCOR_1 \\ | \\ CH-OCOR_2 \\ | \\ CH_2OCOR_1 \end{array} + 3\,KOH \rightarrow \begin{array}{l} CH_2OH \\ | \\ CHOH \\ | \\ CH_2OH \end{array} + 3\,R_1-COOK \qquad (1)$$

$$R'-COOH + KOH \rightarrow R'-COOK + H_2O. \qquad (2)$$

După cum reiese din definiția indicelui de saponificare și din reacțiile (1 și 2), acesta este de fapt rezultanta a două valori: a indicelui acidității grăsimii și a coeficientului de esterificare, care reprezintă cantitatea de KOH (în mg) necesară pentru descompunerea gliceridelor neutre și lactonelor prezente într-un g de material de cercetat.

Reactivi necesari: 1) Hidroxid de sodiu, soluție $N/50$, preparată în alcool etilic; 2) Acid clorhidric, soluție $N/50$; 3) Fenolftaleină, soluție 1%.

Modul de lucru. Într-un balon Erlenmeyer cu fundul plat prevăzut cu șlif, rezistent la acțiunea alcalilor și cu o capacitate de 150—200 ml se cîntăresc eșantioane a 1,5—2,5 g material de analizat. În balon se introduc cu ajutorul unei biurete verificate exact (!) 25 ml soluție de KOH *N*/50 preparată în alcool etilic absolut.

Întrucît titrul soluției de hidroxid de sodiu se modifică, pe de o parte, datorită faptului că alcoolul etilic este parțial oxidat, iar pe de altă parte, datorită formării de bicarbonați, pentru obținerea rezultatelor corecte este necesară verificarea titrului soluției de KOH. În acest scop se prepară proba de control (martorul) care conține 25 ml (exact!) soluție de KOH *N*/50 și este prelucrată în condiții identice cu proba de analizat.

Baloanele sînt montate cu ajutorul șlifurilor la refrigerente cu reflux și saponificate timp de 40—50 de minute pe o baie de apă fierbinte. Din timp în timp, conținutul baloanelor se agită atent, evitîndu-se formarea de emulsii sau pierderea probei. Conținutul baloanelor după saponificare trebuie să se prezinte sub forma unui lichid clar și omogen, fără urme de grăsime sau ulei. Excesul de hidroxid de sodiu, neutilizat pentru saponificarea grăsimilor, este titrat cu soluție de HCl *N*/50 în prezență de fenolftaleină ca indicator. Probele sînt titrate la cald pînă la colorarea soluției în roz pal. Cînd grăsimea animală sau uleiul vegetal sînt colorate, ca indicator se recomandă folosirea de alcaliblau 6 B.

Calculul rezultatelor. Pentru calcularea indicelui de saponificare este necesar să se cunoască cantitatea de KOH exprimată în miligrame consumată pentru saponificarea grăsimilor prezente în proba de analizat. Indicele de saponificare se calculează după formula:

$$x = \frac{(v - v_1) F \times 28{,}055}{P},$$

unde:

v este volumul soluției de HCl *N*/50 necesară pentru titrarea probei martor;

v_1 — ml soluție de acid clorhidric *N*/50 necesari pentru titrarea probelor care conțin materialul supus analizei;

F — factorul soluției de acid clorhidric stabilit cu ajutorul hidroxidului de potasiu;

P — cantitatea de material luat pentru analiză și exprimată în grame;

28,055 — cantitatea de hidroxid de potasiu, exprimată în grame, corespunzătoare la 1 ml de soluție de HCl *N*/50.

Exemplu de calcul. Pentru determinarea indicelui de saponificare au fost cîntărite probe a 2,5 g de material, iar pentru titrarea finală a probelor s-au utilizat 29,1 ml de HCl *N*/50 (media a două titrări), în timp ce pentru proba martor au fost folosiți 66,9 ml soluție de acid clorhidric *N*/50, al cărui factor este de 0,97.

$$\text{Indicele de saponificare} = \frac{(66{,}9 - 29{,}1) \times 0{,}97 \times 28{,}055}{2{,}5} = 410{,}7 \text{ mg KOH}.$$

Importanța practică. Indicele de saponificare indică greutatea moleculară medie a gliceridelor care intră în compoziția grăsimilor și este în

funcție de greutatea moleculară a acizilor grași prezenți în gliceride. Este invers proporțional cu greutatea moleculară a acizilor grași din compoziția gliceridelor, deoarece cu cît aceștia vor fi mai numeroși (greutate moleculară mică), cu atît indicele de saponificare va fi mai mare și invers.

Indicele de saponificare este de asemenea în funcție de prezența substanțelor nesaponificabile, a mono- și digliceridelor, care scad valoarea indicelui, precum și a acizilor grași liberi, care măresc valoarea indicelui.

În fabricarea săpunurilor, indicele de saponificare este utilizat pentru cunoașterea purității și naturii grăsimilor utilizate și pentru calcularea cantității de sodă caustică necesară saponificării, controlîndu-se astfel utilizarea rațională a materialului.

Relația existentă între indicele de saponificare și indicele de aciditate a grăsimilor și între indicele de aciditate și greutatea moleculară a acizilor permite utilizarea indicelui de saponificare pentru calcularea greutății moleculare a gliceridelor neutre. Pentru neutralizarea unei molecule-gram de acid gras M este necesară o moleculă-gram de NaOH (56,108), sau pentru neutralizarea unui gram de acid gras se consumă o cantitate de NaOH egală cu indicele de aciditate. Deci această ultimă relație se poate scrie:

$$M = \frac{56\,108}{Ia},$$

unde

56,108 este o moleculă-gram NaOH, multiplicată cu 1 000 pentru exprimarea rezultatului în miligrame;

— indicele de aciditate.

Din considerațiile teoretice expuse mai sus rezultă că această expresie poate fi scrisă și în cazul indicelui de saponificare (Is):

$$M = \frac{56\,108}{Is}.$$

4.2.7. DETERMINAREA COLESTEROLULUI TOTAL ÎN ȚESUTURI[1] TEHNICA I. F. DUMITRU

Principiul metodei. Colesterolul reacționează cu anhidrida acetică în prezența acidului sulfuric concentrat, rezultînd o coloratie verde.

Reactivi necesari: 1) Alcool etilic absolut; 2) Cloroform chimic pur, proaspăt distilat; 3) Anhidridă acetică, punct de fierbere 140°C, d=1,39; 4) Eter etilic distilat; 5) Acid sulfuric concentrat, d=1,84; 6) Colesterol chimic pur.

[1] Reacția Liebermann-Burchard a fost adaptată pentru dozarea colesterolului în ficat, creier și mușchi, stabilindu-se condițiile experimentale în care legea Lambert-Beer este respectată.

Modul de lucru. Probele din țesutul proaspăt recoltat (200—250 mg, în cazul țesutului hepatic și 100—120 mg, creier) sînt mojarate cu nisip de cuarț și apoi trecute cantitativ, cu ajutorul unei soluții de alcool etilic-eter etilic (3 : 1), în baloane cotate de 25 ml, prevăzute cu dop rodat. Pentru efectuarea operației se utilizează maximum 15 ml de amestec de alcool etilic-eter sulfuric.

Conținutul baloanelor se agită energic. Baloanele se închid și se introduc într-o baie de apă clocotindă și țesutul este extras la cald timp de 30 de secunde. După răcire conținutul baloanelor se aduce la semn cu amestec alcool etilic-eter etilic, se agită atent și se filtrează, utilizîndu-se în acest scop filtru fără cenușă.

Din extractul obținut se iau cu ajutorul unei pipete prevăzute cu bulă 10 ml și se trec într-o eprubetă cu dop rodat. Conținutul eprubetei se evaporă la sec pe o baie de apă și sub nișă, iar reziduul se dizolvă în 10 ml (exact!) de cloroform pur.

Pentru dozarea cantitativă a colesterolului se iau (din cei 10 ml de extract cloroformic) 5 ml, la care se adaugă 1 ml de anhidridă acetică și 3 picături de H_2SO_4 concentrat. Probele se agită energic și se introduc într-o cameră obscură timp de 20—25 de minute pentru dezvoltarea maximă a colorației. Citirea la fotocolorimetru Pulfrich se face la lungimea de undă 633 mμ (filtrul roșu). Proba de control constă din aceiași reactivi, însă fără extract cloroformic, în locul căruia se folosesc 5 ml de cloroform pur. Pentru a calcula cantitatea de colesterol în țesut este necesar să se cunoască concentrația lui în probă. În acest scop se folosesc curba etalon și valoarea *E* citită pentru probă la fotometru.

Construirea curbei etalon. Curba etalon se obține colorimetrînd probe ce conțin cantități diferite de colesterol pur în soluție de cloroform. Se prepară o soluție etalon-stoc de cloroform care conține 1 mg de colesterol la 1 ml de soluție și se pregătesc probe etalon de lucru, care conțin cantități diferite de colesterol, între 50 și 400 μg (tabela 26).

Tabela 26

Construirea curbei etalon pentru dozarea colesterolului în țesuturile animale

Nr. exp.	Soluție standard de cloroform (ml)	Anhidridă acetică (ml)	Cloroform adiționat (ml)	Acid sulfuric concentrat (ml)[1]	Volumul total al probei	Conținutul colesterolului în probă (în μg)	*E*
1	0,05	1	3,95	0,1	5	50	0,05
2	0,10	1	3,90	0,1	5	100	0,95
3	0,15	1	3,85	0,1	5	150	0,13
4	0,20	1	3,80	0,1	5	200	0 17
5	0,25	1	3,75	0,1	5	250	0,21
6	0,30	1	3,70	0,1	5	300	0,245
7	0,35	1	3,65	0,1	5	350	0,28
8	0,40	1	3,60	0,1	5	400	0,325

[1] Aproximativ 4 picături, în cazul folosirii sticlei picătoare.

Proba de control constă din 4 ml cloroform pur, la care se adaugă 1 ml anhidridă acetică și 3 picături de H_2SO_4 concentrat.

Calculul rezultatelor. Folosindu-se extincția citită la fotocolorimetru pentru proba respectivă se află cu ajutorul curbei etalon conținutul de colesterol, exprimat în mg, în probă. Conținutul colesterolului în proba inițială de țesut luată pentru analiză se exprimă în mg% și se calculează după formula:

$$x = \frac{C \cdot A \cdot A_1 \times 100}{G \cdot v \cdot v_1}$$

unde:

C este cantitatea de colesterol în probă (se citește pe curba etalon valoarea E), exprimată în mg;
A — volumul total al extractului alcool etilic-eter etilic (25 ml);
A_1 — volumul extractului cloroformic de colesterol luat pentru determinare (5 ml);
v — volumul extractului alcool etilic-eter etilic luat pentru dozare (10 ml);
v_1 — volumul soluției cloroformice luate pentru citirea la fotocolorimetru (5 ml) și
G — cantitatea de țesut, exprimată în grame.

4.2.8. DETERMINAREA COLESTEROLULUI LIBER ȘI ESTERIFICAT. METODA SCHOENHEIMER ȘI SPERRY.

Principiul metodei se bazează pe dozarea colorimetrică a intensității reacției de culoare Liebermann-Burchard. Colesterolul liber este dozat în precipitatul digitonid — colesterol, iar colesterolul esterificat este calculat, reprezentînd diferența dintre colesterolul total și colesterolul liber.

Reactivi necesari: 1) Acetonă, p.a.; 2) Alcool etilic absolut; 3) Eter etilic, p.a.; 4) Acid acetic glacial; 5) Anhidridă acetică, punct de fierbere 140°C, d=1,39; 6) Acid sulfuric concentrat, d=1,84; 7) Digitonină, soluție 0,1% în apă; 8) Colesterol, soluție standard-stoc: 1 ml de soluție conține 1 mg de colesterol. Soluția standard se prepară în acid acetic glacial și se conservă în frigider. După 7—8 zile, soluția standard se reface; 9) Hidroxid de sodiu, soluție 50%; 10) Acid clorhidric, soluție 5%; 11) Fenolftaleină, soluție 1%.

Modul de lucru

Deproteinizarea sîngelui sau plasmei sanguine. Într-un balon cotat prevăzut cu dop rodat se pun cu pipeta 3 ml de amestec alcool etilic absolut și acetonă (în proporție de 1 volum de CH_3CH_2OH și 1 volum de $CH_3—CO—CH_3$) și balonul se încălzește pe o baie de apă pînă la fierberea amestecului. În momentul fierberii se introduc în balonul cotat 0,2 ml de plasmă sanguină sau de sînge total. Adăugarea plasmei sau a sîngelui se

face picătură cu picătură și suficient de rapid pentru a preîntîmpina coagularea proteinelor pe vîrful pipetei. Balonul cotat se închide cu dopul rodat și conținutul se agită energic timp de 30—45 de secunde pentru diminuarea dimensiunilor coagulatelor de proteină. Dopul rodat al balonului este spălat cu amestec alcool etilic absolut — acetonă și conținutul balonului se încălzește la fierbere pe o baie de apă, evitîndu-se pierderea lichidului. După răcire, la temperatura camerei de lucru, volumul balonului se aduce la semn cu amestec alcool etilic-acetonă, se agită cu grijă și se filtrează folosindu-se un filtru fără cenușă (Schleicher-Schull 2043-B). Pentru evitarea evaporării filtratului în timpul filtrării, pîlnia se acoperă cu o sticlă de ceas de dimensiuni potrivite.

Determinarea colesterolului total. Într-o eprubetă de centrifugă se pune cu pipeta 1 ml de filtrat deproteinizat și se adaugă 0,1—0,2 ml de soluție 50% de NaOH. Conținutul eprubetei se agită energic cu ajutorul unei baghete de sticlă și eprubeta de centrifugă se introduce într-un termostat la 40°C, timp de 30 de minute. Colesterolul esterificat în prezența hidroxidului de sodiu concentrat și la cald este hidrolizat cu formare de acizi grași și colesterol liber. După $^1/_2$ oră conținutul eprubetei este răcit la temperatura laboratorului. Se adaugă cu pipeta 1 ml de amestec alcool etilic-acetonă și amestecul este acidulat cu soluție 5% de HCl în prezența fenoftaleinei ca indicator. La amestecul de analiză acidulat se adaugă cu pipeta 1 ml de soluție 0,1% de digitonină, se agită energic și prudent și se lasă în repaus 1 oră, după care se centrifughează la 4 000—5 000 turații/minut.

Partea alicotă este decantată sau sifonată, evitîndu-se pierderea precipitatului și eprubeta de centrifugă (pereții ei) și bagheta de sticlă utilizată pentru agitare sînt spălate cu amestec eter sulfuric-acetonă (2 : 1 vol/vol). Precipitatul este de asemenea agitat pentru a fi spălat și centrifugat. Partea alicotă este din nou îndepărtată și precipitatul spălat de 2 ori cu eter etilic. Urmele de eter etilic sînt îndepărtate prin încălzirea eprubetei pe o baie de apă, încălzită la 40°C, timp de 3—5 minute.

Reziduul uscat din eprubetă se dizolvă în 1 ml de acid acetic glacial. Dizolvarea este accelerată prin încălzirea probei pe o baie de apă la 60°C. După răcirea soluției pînă la temperatura camerei (20—25°C) se adaugă 2 ml de anhidridă acetică și 0,1 ml de H_2SO_4 concentrat, se agită cu grijă și proba se lasă în repaus timp de 25—27 de minute la întuneric, după care se colorimetrează[1].

Determinarea colesterolului liber. La 2 ml de filtrat deproteinizat se pune cu pipeta într-o eprubetă de centrifugă 1 ml soluție 0,1% de digitonină. Proba se lasă în repaus timp de 1 oră și precipitatul de digitonid-

[1] Colorimetrarea probelor, obținerea curbei etalon și calculul rezultatelor se realizează după același sistem ca în cazul dozării colesterolului în țesuturile animale. Singura deosebire constă în faptul că pentru obținerea curbei etalon se utilizează o soluție standard de colesterol, preparată în acid acetic glacial, iar pentru aducerea probelor la un volum egal (5 ml) se folosește acid acetic concentrat. Proba martor folosită pentru citirea probelor la fotocolorimetru constă din 4 ml acid acetic, 2 ml de anhidridă acetică și 0,1 ml de H_2SO_4 concentrat.

colesterol este spălat cu amestec acetonă-eter etilic (1 : 2 vol/vol) și cu eter etilic (de 2 ori) ca și în cazul descris pentru colesterolul total.

Diferența dintre cantitatea de colesterol total și cantitatea de colesterol liber reprezintă colesterolul esterificat.

Valoarea diagnostică. În sîngele total al pacienților sănătoși, colesterolul total variază între 170 și 210 mg%, iar cantitatea de colesterol esterificat, între 85 și 130 mg%. În plasma sanguină, colesterolul total este aproximativ de 160—260 mg%, iar nivelul colesterolului esterificat variază între 41 și 73 mg%.

Cantitatea de colesterol crește în bolile de ficat (hepatită, ciroză, cancer), bolile de rinichi (nefrite, uremii), în maladiile aparatului cardiovascular (arterioscleroză, hipertonii etc.), în infecții și, de asemenea, în avitaminoze grave. Dimpotrivă, unele boli sînt însoțite de hipocolesterolemii, de exemplu, boala Basedow, anemia pernicioasă, insuficiențe hormonale etc.

4.2.9. DETERMINAREA DIRECTĂ A FRACȚIEI LIPIDELOR NEUTRE. METODA POKROVSKI

Principiul metodei. Din extractul cloroformic al lipidelor totale, fosfatidele sînt separate prin adsorbția pe coloană de silicagel activat, iar fracția lipidelor neutre este hidrolizată cu NaOH în alcool. După hidroliza lipidelor neutre, hidroxidul de sodiu este neutralizat cu ajutorul acidului sulfuric, și alcoolul este îndepărtat prin evaporare la cald. Glicerina este oxidată cu formare de formaldehidă prin tratarea hidrolizatului cu soluție de metaperiodat de sodiu. Iodatul și periodatul formați sînt reduși cu arsenit sau cu bisulfit de sodiu și formaldehida este determinată colorimetric direct în amestecul de reacție.

Reactivi necesari: 1) Cloroform distilat; 2) Silicagel activat la temperatura de 170°C, timp de 24 de ore; 3) Acid sulfuric, soluție 0,2 *N;* 4) Hidroxid de sodiu, soluție 0,4%, preparată în alcool. Se dizolvă 2 g de NaOH în 20—25 ml de alcool etilic 95% și soluția se aduce la 100 ml cu apă distilată. Înainte de utilizare 10 ml din această soluție se diluează la 50 ml cu apă distilată; 5) Acid 1,8—dioxinaftalen—3,6—disulfuric, soluție. Se dizolvă 2 g de acid în 200 ml de apă distilată. La 300 ml apă distilată răcită se adaugă în porții mici 600 ml H_2SO_4 concentrat. Întreg volumul se adaugă la cei 200 ml de acid și amestecul final se păstrează în sticle brune. Soluția se înlocuiește la fiecare 2—3 săptămîni; 6) Arsenit de sodiu, soluție 2*M*. Se dizolvă 9 g de NaOH și 20 g de anhidridă arsenică pură în apă. Volumul se aduce la 100 ml cu apă distilată. Se poate utiliza cu succes în locul arseniatului de sodiu și o soluție de 5% bisulfat de sodiu; 7) Metaperiodat de sodiu, soluție 0,05 M. Se dizolvă 1,07 g preparat anhidru de metaperiodat de sodiu în 100 ml de apă distilată; 8) Soluție standard-stoc de trigliceride (0,05 mg/ml). Se dizolvă 0,5 g de trioleină în cloroform și se aduce la 100 ml cu același solvent. Soluția standard de lucru se prepară prin diluția soluției standard-stoc cu cloroform (1 : 100).

Modul de lucru

Prepararea extractului lipidelor tisulare după Vladimirov și colaboratorii. Omogenatul tisular este tratat cu acetonă, extras cu amestec

de cloroform — alcool metilic (2 : 1 vol/vol). Extractul este supus ulterior operației de îndepărtare a componentelor nelipidice prin spălarea lui după tehnica F o l c h, modificată de noi.

Determinarea lipidelor neutre. Un volum determinat de extract cloroform-alcool metilic, care corespunde la 0,2—0,3 mg de lipide neutre, se trece într-o eprubetă obișnuită. Solventul este evaporat într-un curent de azot, la temperatura de 37—40°C (se încălzește pe o baie de apă conținutul eprubetei). După evaporarea la sec a amestecului cloroform-alcool metilic, în eprubetă se introduc 5 ml de cloroform pur și 0,1 g de silicagel activat. Conținutul eprubetei este agitat cu un agitator mecanic timp de 30 de minute și ulterior filtrat.

Din filtratul obținut se recoltează în trei eprubete de centrifugă trei probe a cîte 1 ml fiecare. Concomitent, în alte trei eprubete de centrifugă se introduce cîte 1 ml soluție standard de trioleină diluată. Cloroformul prezent în toate probele este evaporat la sec pe o baie de apă, la temperatura de 30—40°C, și într-un curent de azot.

În primele două eprubete din fiecare serie (cu extract lipidic și cu soluție standard) se adaugă cu pipeta o soluție alcoolică de hidroxid de potasiu, cîte 0,5 ml. În eprubeta a treia din fiecare serie se adaugă alcool etilic 95%, 0,5 ml. Toate eprubetele se introduc într-o baie de apă la temperatura de 60—70°C, timp de 20 de minute, după care în fiecare se adaugă 0,5 ml de soluție H_2SO_4 0,2 *N*. Alcoolul etilic este îndepărtat prin introducerea probelor într-o baie de apă fierbinte (25 de minute). Probele sînt răcite la temperatura camerei de lucru și în fiecare se adaugă cu pipeta cîte 0,1 ml metaperiodat de sodiu. După 10 minute de la adăugarea acestui reactiv, se introduce 0,1 ml arsenit de sodiu sau bisulfit de sodiu. După 5—10 minute, în fiecare probă se adaugă 5 ml soluție de acid 1,8-dioxinaftalin- 3,6-disulfonic și conținutul eprubetelor se agită energic. Toate eprubetele sînt introduse într-o baie de apă în clocot timp de 30 de minute. Conținutul eprubetelor se colorează în vișiniu-închis. După 30 de minute, probele sînt răcite într-un curent de apă de robinet și densitatea optică a probelor se determină la electrofotocolorimetrul FEK-M, folosindu-se filtrul verde.

Calculul rezultatelor. Cantitatea de lipide neutre în probele de cercetat se calculează după formula:

$$A = 0{,}05 \times \frac{D.O.\text{ proba saponificată} - D.O.\text{ proba nesaponificată}}{D.O.\text{ proba standard saponificată} - D.O.\text{ proba standard nesaponificată}},$$

unde:

A este cantitatea de lipide neutre în proba de cercetat, exprimată în mg;

0,05 — concentrația trioleinei în probele standard de lucru.

Observații. Folosirea bisulfitului de sodiu pentru reducerea iodaților și periodaților care se formează pe parcursul oxidării glicerinei este mult mai avantajoasă decît utilizarea arsenitului de sodiu. Prepararea soluției

de bisulfit este mult mai simplă, acesta nu este otrăvitor și față de arsenit are avantajul că micșorează la minimum apariția unei colorații galbene în probele de control.

Randamentul metodei este de 90% și metoda poate fi utilizată cu succes pentru determinarea lipidelor neutre și în plasma sanguină, în sînge, în țesuturi și organe.

4.2.10. DETERMINAREA ACIZILOR GRAȘI PRIN CROMATOGRAFIE PE HÎRTIE METODA FOMIN ȘI COLABORATORII

Principiul metodei. Acizii grași sînt extrași cu ajutorul solvenților organici și extractul separat prin metoda cromatografiei pe hîrtie. Sărurile rodanice ale acizilor grași sînt identificate după developarea cromatogramelor și conținutul procentual al principalilor acizi grași determinat.

Reactivi necesari: 1) Acetat de cupru, soluție (preparată din 20 ml soluție saturată de acetat de cupru diluați la 1 l de apă; 2) Fericianură de potasiu, soluție 2%; 3) Clorură ferică, soluție 5%; 4) Ulei de vaselină; 5) Hidroxid de potasiu 1,5 g; 6) Alcool etilic absolut; 7) Eter etilic, p.a.; 8) Acid sulfuric, soluție 25%; 9) Acetonă, p.a.; 10) Acid acetic glacial 97%; 11) Hîrtie cromatografică Whatman nr. 1: 12) Grăsime 5 g.

Modul de lucru

Extracția cantitativă a acizilor grași din grăsimi. Într-un balon termorezistent prevăzut cu șlif se cîntăresc 5 g grăsime, 1,5 g de NaOH și 15 ml de alcool etilic adăugați cu pipeta. Conținutul balonului este saponificat pe o baie de apă încălzită la fierbere timp de 5—7 minute, după care se trece cantitativ într-o pîlnie de separare în care scop se folosesc aproximativ 50 ml apă distilată.

Extracția insaponifiabilului se realizează prin prelucrarea repetată (de 3—4 ori) a materialului cu cîte 50 ml de eter, îndepărtîndu-se stratul inferior după fiecare extracție. Acizii grași sînt separați prin adăugarea a 6 ml de soluție 25% de acid sulfuric. Amestecul se agită energic și se adaugă cu pipeta o cantitate mică (2—3 ml) de eter pentru dizolvarea acizilor grași extrași. Stratul inferior, care conține acid sulfuric, este îndepărtat, iar cel superior (eter+acizii grași) — se trece într-un pahar Berzelius. Extractul se evaporă la sec pe o baie de apă sub nișă, pînă la dispariția mirosului de eter. Se prepară o soluție 1% de acizi grași în acetonă.

Prepararea hîrtiei cromatografice. Hîrtia cromatografică Whatman nr. 1 se taie în fîșii de 10×50 cm și se extrage în aparatul Soxhlet cu eter. Se îmbibă apoi cu o soluție 10% de ulei de vaselină dizolvată în eter.

Soluția acetonică a acizilor grași este aplicată cu ajutorul unei micropipete pe hîrtia cromatografică. Volumul soluției aplicate variază între 0,1 și 0,15 ml de extract acetonic. Soluția de cercetat se aplică în cantități mici pentru a nu provoca apariția unor pete cu diametru mare. Pentru accelerarea procesului de aplicare a soluției, hîrtia poate fi uscată într-un curent de aer cald.

Separarea componenților. Cromatogramele se montează în tancul cromatografic și separarea se efectuează prin procedeul cromatografiei ascendente sau descendente. Ca solvenți se utilizează soluția de acid acetic 98% și separarea are loc la 20°, timp de 24 de ore. După aceasta, cromatogramele se scot din camera cromatografică, se notează frontul solventului și se usucă într-un termostat la temperatura de 18—20°C pînă la dispariția mirosului de acid acetic.

Developarea cromatogramelor. După uscarea cromatogramele se introduc (într-un pahar Berzelius cu o capacitate de 50 ml) pentru 30 de minute într-o soluție de acetat de cupru, apoi se spală cu apă de robinet timp de 30 de minute, iar în final, de 3—4 ori cu apă distilată. Se introduc apoi pentru 5 minute într-o soluție de fericianură de potasiu și din nou sînt spălate ca mai sus. Timp de 5—7 minute se introduc într-o soluție de clorură ferică, după care cromatogramele sînt spălate într-un curent de apă de robinet și apă distilată acidulată cu acid sulfuric. În final, cromatogramele sînt spălate cu apă distilată și uscate la temperatura camerei. Pe un fond incolor apar spoturi net colorate în albastru, care sînt de fapt săruri rodanice ale acizilor grași.

Identificarea acizilor grași. În cazul folosirii de martori, identificarea se face prin procedeul comparației, iar în caz contrar, după valorile *Rf* ale spoturilor.

Determinarea conținutului procentual al acizilor grași separați. În acest scop se folosește densimetrul cu ajutorul căruia se obține curba densității culorii diferitelor spoturi (fig. 59). Pe linia izoelectrică se coboară perpen-

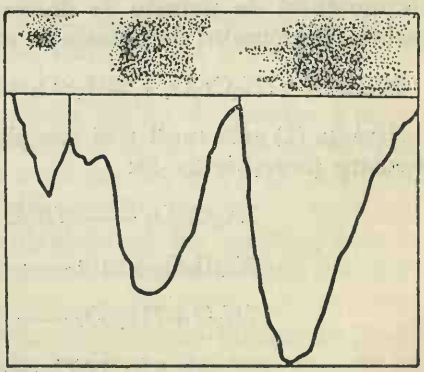


Fig. 59. Densitograma acizilor grași (după Fomin și colaboratorii):

diculare care separă spoturile acizilor graşi sau prin compararea curbei cu cromatogramele se stabileşte corespondenţa dintre spoturi şi maximele curbei (picuri). Suprafaţa delimitată de linia izoelectrică şi curba densitogramei corespunzătoare fiecărui acid gras în parte se decupează şi se cîntăreşte la balanţa analitică.

Conţinutul în procente al fiecărui acid gras se calculează după formula:

$$A_{x_1} = \frac{Dx \times Mx. \times 100}{Dx. Mx_1 + Dx_2 \times Mx_2 + Dx_3 Mx_3},$$

unde:

Ax_1 este cantitatea de acid gras (în %);

Dx_1 — greutatea porţiunii de hîrtie densitometrică care corespunde acidului gras respectiv;

Mx_1 — greutatea moleculară a acidului gras.

Exemplu de calcul. Fie trei acizi graşi, linolic, oleic şi stearic şi porţiunile corespunzătoare de densitograme care cîntăresc 0,1376 g, 0,0871 g şi, respectiv, 0,0271 g.

$$\text{linolic \% acid} = \frac{0{,}1376 \times 280{,}46 \times 100}{0{,}1376 \times 280{,}46 + 0{,}0871 \times 282{,}48 + 0{,}0271 \times 284} = 34{,}70\%.$$

$$\text{oleic \% acid} = \frac{0{,}0871 \times 282{,}48 \times 100}{0{,}1376 \times 280{,}46 + 0{,}0871 \times 282{,}48 + 0{,}0271 \times 284{,}49} = 34{,}70\%.$$

$$\text{stearic \% acid} = \frac{0{,}0271 \times 284{,}49 \times 100}{0{,}1376 \times 280{,}46 + 0{,}0871 \times 282{,}48 + 0{,}0271 \times 284{,}49} = 10{,}87\%.$$

Eroarea metodei Fomin, Fedorov, Kasatkin nu depăşeşte 4,5—5%.

4.2.11. DETERMINAREA GLICERINEI

Principiul metodei. Glicerina în mediu acid şi în prezenţa bicromatului de potasiu se descompune cu formare de apă şi bioxid de carbon. Bicromatul de potasiu în exces este dozat iodometric.

$$3C_3H_8O_3 + 7K_2Cr_2O_7 + 28H_2SO_4 = 9\,CO_2 + 7K_2SO_4 + 7Cr_2(SO_4)_3 + 40H_2O. \quad (1)$$

Reacţia (1) este mult mai complexă şi decurge în mai multe etape intermediare (reacţiile 2—5):

$$7K_2Cr_2O_7 \longrightarrow 7K_2O + 7Cr_2O_3 + 21O \quad (2)$$

$$3C_3H_8O_3 + 21O \longrightarrow 9CO_2 + 12H_2O \quad (3)$$

$$7K_2O + 7H_2SO_4 \longrightarrow 7K_2SO_4 + 7H_2O \quad (4)$$

$$7Cr_2O_3 + 21H_2SO_4 \longrightarrow 7Cr_2(SO_4)_3 + 21H_2O. \quad (5)$$

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Excesul de bicromat de potasiu din soluția de analizat este dozat iodometric (6), (11):

$$K_2Cr_2O_7 + 6KI + 14HCl = 3I_2 + 8KCl + 2CrCl_3 + 7H_2O. \quad (6)$$

Reacția (6) decurge în mai multe etape și din mecanismul ei se poate constata că pentru fiecare moleculă de $K_2Cr_2O_7$ în exces sînt eliberate trei molecule de iod (reacțiile 7—10):

$$K_2Cr_2O_7 \longrightarrow K_2O + Cr_2O_3 + 3O \quad (7)$$

$$3O + 6KI \longrightarrow 3K_2O + 3I_2 \quad (8)$$

$$4K_2O + 8HCl \longrightarrow 8KCl + 4H_2O \quad (9)$$

$$Cr_2O_3 + 6HCl \rightarrow 2CrCl_3 + 3H_2O. \quad (10)$$

Cantitatea de iod rezultată și echivalentă excesului de bicromat de potasiu este titrată cu tiosulfat de sodiu (reacția 11):

$$3I_2 + 6Na_2S_2O_3 = 6NaI + 3Na_2S_4O_6. \quad (11)$$

Reactivi necesari: 1) Sulfat de zinc, soluție 5%; 2) Bicromat de potasiu, soluție. Se dizolvă 75 g de $K_2Cr_2O_7$ în 450—500 ml de apă distilată, la care se adaugă 105 ml de H_2SO_4 concentrat. Volumul soluției, după răcire, se aduce la 1 l cu apă distilată; 3) Acid sulfuric, soluție 30%; 4) Iodură de potasiu, preparat; 5) Acid clorhidric, soluție 20%; 6) Tiosulfat de sodiu, soluție *N*/10; 7) Iodat de potasiu, soluție *N*/10.

Modul de lucru. Într-un pahar Berzelius se cîntărește la balanța analitică 1 g de glicerină (sau unt de masă). Se adaugă 5 ml de soluție 5% de $ZnSO_4$ și amestecul se agită energic și se trece cantitativ într-un balon cotat de 100 ml. Volumul soluției se aduce la 100 ml cu apă distilată și dacă soluția este tulbure se filtrează.

Din filtratul obținut se iau, într-un balon cu fundul rotund și o capacitate de 250 ml, 5 ml la care, se adaugă 10 ml de soluție de bicromat, 10 ml de soluție de H_2SO_4 30% și conținutul balonului se încălzește timp de 1 oră pe o baie de apă în clocot. După 1 oră soluția se răcește și volumul se aduce la 100 ml cu apă distilată.

Pentru dozarea glicerinei se iau cu pipeta 20 ml de soluție și se pun într-un balon Erlenmeyer, se adaugă 1 g de KI și 10 ml de soluție HCl, 20% și amestecul se titrează cu soluție de $Na_2S_2O_3$ *N*/10 în prezența amidonului, pînă la apariția unei colorații albastre pal.

Paralel se face o probă martor, folosindu-se aceiași reactivi, însă fără glicerină și se verifică cu ajutorul iodatului de potasiu factorul soluției de tiosulfat.

Calculul rezultatelor. Dacă pentru proba martor s-au utilizat 30,1 ml de soluție de $Na_2S_2O_3$ *N*/10 și media a două titrări pentru proba de glicerină

(două probe paralele) este de 17,05 ml de $Na_2S_2O_3$, factorul acestei soluții fiind 1,03, cantitatea de glicerină prezentă într-un gram va fi egală cu:

$$(30,1—17,05)\cdot 1,03\times 0,657\times 5\times 20=900 \text{ mg},$$

unde 0,657 este coeficientul de corespondență: 1 ml de soluție de $Na_2S_2O_3$ *N*/10 este echivalent unei cantități de 0,657 g de glicerină. Rezultatul se exprimă de regulă în %. În cazul de mai sus, în materialul analizat (unt de masă), glicerina formează 90%.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

CAPITOLUL 5

VITAMINE ŞI HORMONI

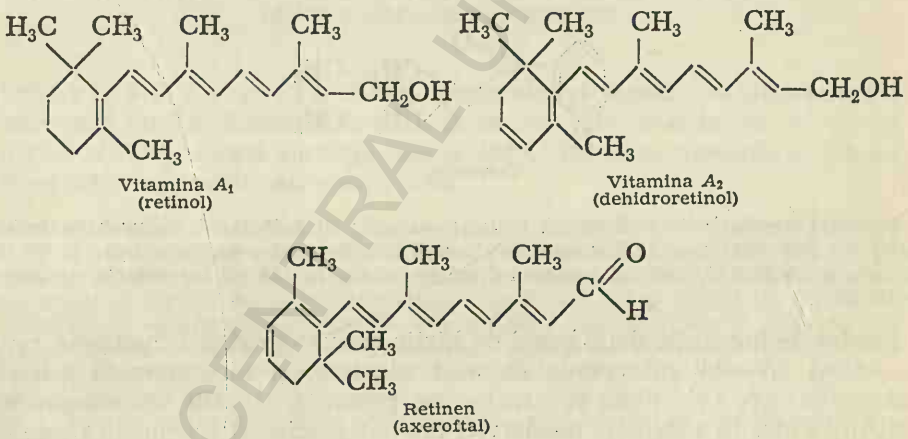
5.1. ANALIZA CALITATIVĂ

5.1.1. IDENTIFICAREA VITAMINEI *A* (REACŢIA CARR-PRICE)

Principiul reacţiei. Soluţiile cloroformice de vitamină *A* se colorează în albastru în prezenţa soluţiei saturate de triclorură de stibiu.

Modul de lucru. Se introduce într-o eprubetă 1 ml de extract cloroformic de vitamină *A* şi 0,5 ml de soluţie saturată de $SbCl_3$. Se formează o coloraţie albastră.

Reacţia Carr-Price nu este strict specifică pentru vitamina *A*, rezultate pozitive obţinîndu-se şi în cazul anhidrovitaminei *A*, retinenului şi esterilor vitaminei *A*.



5.1.2. IDENTIFICAREA VITAMINEI B_1 ŞI A DERIVATELOR EI

Principiul reacţiei. Tiaminele în soluţie şi în prezenţa iodurii de bismut formează o coloraţie roşie-purpurie sau portocalie.

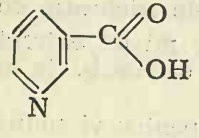
Reactivi necesari: 1) Iodură de bismut. Se dizolvă 0,5 g de iodură de bismut în 100 ml de apă distilată care conţine 0,5 ml de HCl concentrat. Soluţia se încălzeşte uşor pe o baie de apă pentru dizolvarea completă a iodurii şi după răcire se filtrează.

BCU CLUJ / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

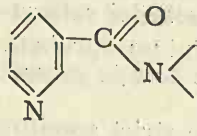
Modul de lucru. Într-o eprubetă se pun cu pipeta 0,5 ml de soluţie extract care conţine tiamină şi 1 ml de iodură de bismut. Se formează o coloraţie roşie-purpurie. Sensibilitatea reacţiei este de 0,1 μg.

5.1.3. IDENTIFICAREA ACIDULUI NICOTINIC ŞI NICOTINAMIDEI. METODA CROMATOGRAFIEI PE HÎRTIE

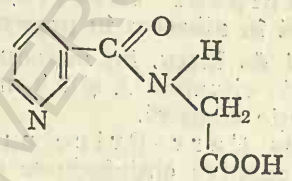
Principiul reacţiei. Acidul nicotinic şi derivaţii săi (nicotinamida, acidul nicotinuric, coramina) sînt separaţi prin metoda cromatografiei pe hîrtie şi după pulverizarea cromatogramelor cu o soluţie de acid p-aminobenzoic dau spoturi colorate diferit: galben, roşu, portocaliu, violet etc.



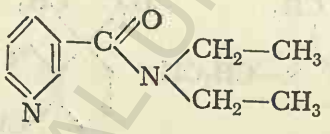
Acid nicotinic



Nicotinamidă



Acid nicotinuric



Coramină

Reactivi necesari: 1) n-Butanol, saturat cu apă; 2) n-Butanol, saturat cu apă+ 0,1% NH_3; 3) Acid p-aminobenzoic. Se dizolvă 2 g de acid p-aminobenzoic în 75 ml de soluţie de HCl 0,75 *N* şi volumul final se aduce la 100 ml cu soluţie de alcool etilic 96%.

Modul de lucru. Pe două benzi de hîrtie cromatografică Whatmann nr. 1 se aplică 0,1—0,2 ml soluţie de acid nicotinic şi nicotinamidă sau de extract în care cele două substanţe sînt prezente. Benzile cromatografice sînt introduse în tancurile (camerele) cromatografice şi cromatografiate cu unul din amestecurile de butanol, timp de 10 ore, folosindu-se procedeul cromatografiei descendente.

Cromatogramele sînt extrase din tancurile cromatografice, uscate la temperatura camerei şi introduse într-un vas de sticlă în care se găseşte o soluţie de BrCN. După 1 oră de expunere în soluţia de BrCN, cromatogramele sînt din nou uscate şi developate prin pulverizare cu soluţie de acid p-aminobenzoic 2%. Valorile *Rf* se calculează pentru fiecare spot. În tabela 27 sînt expuse valorile *Rf* şi coloraţia spoturilor pentru cazul acidului nicotinic şi nicotinamidei.

Tabela 27

Valorile *Rf* şi culoarea spoturilor acidului nicotinic şi nicotinamidei (Cromatografie descendentă)

Materialul cromatografiat	*Rf* compuşilor în solvenţi		Coloraţia spoturilor
	n-butanol saturat cu apă	n-butanol saturat cu apă şi 0,1 % NH_3	
Acid nicotinic	0,21	0,19	galbenă
Nicotinamidă	0,69	0,69	galben-intens

Developarea cromatogramelor, cînd cromatografia a fost realizată utilizînd ca solvent amestecul de alcool butilic-acid acetic, se efectuează cu ajutorul soluţiei de anilină 2%, preparată în soluţie de fosfaţi *M*/15. Spotul nicotinei (*Rf*=0,45) este colorat în galben-roşu, iar cel al nicotinamidei (*Rf*=0,70), violet-închis.

5.1.4. IDENTIFICAREA ACIDULUI ASCORBIC ŞI DEHIDROASCORBIC. METODA MAPSON ŞI PARTRIDGE

Principiul reacţiei. Acidul ascorbic şi acidul dehidroascorbic reacţionează cu 2,6-diclorindofenolul şi cu soluţiile amoniacale de azotat de argint la temperatura camerei, sau la 100°C, colorînd spoturile în alb pe un fond albastru-închis sau brun-închis.

Reactivi necesari: 1) Butanol — acid acetic — apă în proporţie 40 : 10 : 50+5—10 mg de KCN; 2) 2,6—diclorindofenol, soluţie preparată prin dizolvarea a 0,8 g de 2,6—diclorindofenol în 1 l de apă distilată, la care se adaugă un volum egal de alcool etilic; 3) Azotat de argint amoniacal. Se dizolvă 2,6 g $AgNO_3$ în 50 ml de apă distilată şi se adaugă hidroxid de amoniu pînă cînd precipitatul brun format iniţial se dizolvă complet. Excesul de amoniac trebuie să fie evitat. Soluţia astfel obţinută se aduce la 100 ml cu apă distilată. Soluţia *NU SE CONSERVĂ*, deoarece în timpul păstrării este posibilă formarea unui precipitat exploziv, îndeosebi sub influenţa razelor solare; 4) Extract obţinut din material vegetal (v. metoda de dozare a acidului ascorbic).

Modul de lucru. După aplicarea extractului şi a soluţiilor martor la linia de strat şi după completa uscare a benzilor cromatografice la temperatura camerei (a se evita încălzirea!) se realizează cromatografia amestecului şi eşantioanelor de control, folosindu-se procedeul cromatografiei descendente. Benzile cromatografice, realizate în dublu exemplar, sînt apoi uscate la temperatura camerei şi developate prin pulverizarea separată cu solvenţii (2) şi (3). Valorile *Rf* şi coloraţia spoturilor care se obţin în funcţie de natura substanţei sînt redate în tabela 28.

Tabela 28

Valorile *Rf* şi reacţia de culoare ale acizilor ascorbic şi dehidroascorbic (Cromatografie descendentă)

Acidul	Reacţia de culoare cu:			Valorile *Rf*
	2,6-diclor-indofenol	Azotatul de argint amoniacal		
		25°C	100°C	
Acidul ascorbic	alb	negru	negru	0,37
Acidul dehidroascorbic	nu reacţionează	brun clar	brun-închis	0,41

Metoda Mapson şi Partridge permite separarea şi identificarea acidului ascorbic şi a altor substanţe cu grupări dienol, cum sînt, de exemplu, acidul isoascorbic ($Rf=0,38$), acidul hidroxitetronic ($Rf=0,63$) etc.

5.2. ANALIZA CANTITATIVĂ

5.2.1. DETERMINAREA CAROTENOIZILOR. METODA CROMATOGRAFIEI PE COLOANĂ

Principiul metodei. Carotenoizii sînt extraşi din materialul vegetal cu ajutorul solvenţilor organici, trecuţi pe o coloană de MnO, şi şi după eluarea coloanei şi separarea lor de pigmenţii coloraţi prezenţi în extract sînt dozaţi colorimetric.

Reactivi necesari: 1) Hidroxid de sodiu, soluţie 5% preparată în alcool; 2) Sulfat de sodiu, solid; 3) Eter de petrol (fracţia cu punctul de fierbere 55—70°C) sau benzen (fracţia cu punctul de fierbere între 70 şi 80°C); 4) Azobenzen, soluţie standard. În 100 ml de alcool etilic (96°) se dizolvă 14,5 mg de azobenzen p.a.; 1 ml de soluţie corespunde unei cantităţi de 0,00235 mg de carotenoizi într-un mililitru de extract; 5) Bicromat de potasiu, soluţie standard. Se dizolvă 360 mg de bicromat de potasiu (recristalizat de 3 ori) într-un litru de apă bidistilată. Un ml soluţie de bicromat de potasiu corespunde la 0,00208 mg carotenoizi/1 ml.

În calitate de adsorbant, pentru separarea pe cale cromatografică a carotenoizilor, adesea sînt utilizate preparatele de acid silicic, silicagel, sulfat de calciu, carbonat sau fosfat de calciu, talc, zahăr, oxid de aluminiu, hidroxid de aluminiu etc.

Pentru separarea şi dozarea cantitativă a carotenoizilor se utilizează coloana de MnO. Preparatul de MnO trebuie să corespundă următoarelor cerinţe:

— cantitatea de carotenoizi prezenţi într-o soluţie de benzen (sau eter de petrol), care după aplicarea pe coloana de MnO nu este reţinută, nu trebuie să depăşească 15% din cantitatea totală prezentă iniţial în extractul supus analizei;

— adsorbantul folosit, în cazul de față MnO, trebuie să rețină integral licopina. În caz contrar, este necesară modificarea capacității de adsorbție a preparatului de MnO. Această operație se realizează fie prin umectarea adsorbantului (capacitatea de a reține carotenoizii scade), fie prin expunerea acestuia la o temperatură de 100—105°C timp de cîteva zile. În acest caz, capacitatea de adsorbție a preparatului față de licopină crește.

Pentru verificarea capacității de adsorbție a adsorbantului și selecționarea condițiilor optime de lucru se folosesc după probe: (*a*) testul carotenoizilor și (*b*) testul licopinei.

Determinarea procentului de pierdere a carotenoizilor prin adsorbția ireversibilă a acestora pe coloana de MnO. Testul este condiționat de faptul că solvenții organici folosiți pentru eluția carotenoizilor dintr-o coloană de MnO nu extrag întreaga cantitate de carotenoizi aplicată inițial pe coloană. Pentru a calcula corect rezultatele unei determinări este necesar să se cunoască cantitatea de carotenoizi reținută pe coloană. În acest scop se prepară o soluție standard de carotenoizi prin dizolvarea a 0,05 g de carotenoizi în 50 ml de benzen (sau eter de petrol). Din această soluție prin diluare se prepară o soluție de lucru care conține 0,01 mg/1 ml. Se aplică pe coloana cromatografică 10 ml din soluția de lucru și eluția se face cu benzen sau eter de petrol (în funcție de solventul utilizat pentru prepararea soluției standard și a coloanei). Coloratia primelor eluate (benzen+carotenoizi) este galbenă pal. Eluția se continuă pînă cînd eluatele devin perfect clare. Cantitatea de carotenoizi eluată din coloană se dozează colorimetric (v. mai jos) și se notează concentrația. Fie *a* cantitatea carotenoizilor totali în eluatele obținute. Eluatele sînt reunite și soluția se evaporă la sec sub nișă pe o baie de apă. Reziduul se dizolvă în 2—3 ml de benzen și se aplică din nou pe o coloană de MnO proaspăt preparată* și coloana este eluată, cantitatea de carotenoizi fiind dozată ulterior. Fie *b* cantitatea totală a carotenoizi obținută după eluția coloanei. Diferența *a*—*b* reprezintă cantitatea de carotenoizi reținută pe coloana MnO și această cantitate se notează, ea utilizîndu-se în calculul rezultatelor obținute pentru probele în care cantitatea de carotenoizi este necunoscută.

Testul licopinei. Într-o coloană de MnO proaspăt preparată se introduce 1 ml soluție de licopină 1%, preparată în benzen sau în eter de petrol. Eluția ulterioară a coloanei cu solvenți organici nu trebuie să influențeze poziția inelului colorat format de licopină pe coloana de MnO. Ulterior se introduc în coloană 2 ml de soluție de carotenoizi (1 ml de soluție trebuie să conțină între 0,005 și 0,02 mg de carotenoizi) și eluția coloanei cu solvenți trebuie să extragă carotenoizii fără a influența asupra poziției inelului roz format de licopină.

Dacă adsorbantul corespunde acestor cerințe se procedează la cromatografierea preparatelor ce conțin cantități necunoscute de carotenoizi.

* Prin aplicarea soluțiilor de carotenoizi pe coloană de MnO se recomandă evitarea agitării masei adsorbantului sau apariția de fisuri și fose pe suprafața MnO din coloană.

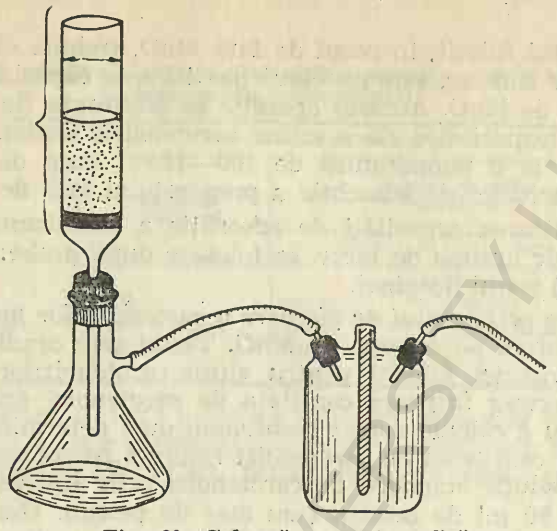


Fig. 60. Coloană cromatografică.

Prepararea coloanei cromatografice. Coloana cromatografică (fig. 60) reprezintă un tub de sticlă efilat la partea inferioară, lung de 120—150 mm şi cu diametrul de 10—15 mm. În partea inferioară a coloanei se găseşte un strat subţire de vată de sticlă sau de vată obişnuită, curată. Coloana se montează cu ajutorul unui dop de cauciuc într-un balon Bünsen conectat la trompa de vid prin intermediul unui vas de spălare. Adsorbantul (2 g de MnO) se amestecă cu o cantitate corespunzătoare de benzen sau eter de petrol (10—15 ml), amestecul obţinut se trece în coloană pînă cînd jumătate din înălţimea acesteia, aproximativ 67 mm, este ocupată de adsorbant. Coloana astfel preparată este spălată cu cantităţi mici de benzen sau eter de petrol, evitîndu-se formarea bulelor de aer între adsorbant şi pereţii coloanei. Tot în acest scop, deasupra adsorbantului trebuie să existe întotdeauna un strat subţire de benzen sau eter de petrol.

Prepararea materialului pentru analiză. Materialul de analizat (fructe, legume — salată, spanac, morcovi — material vegetal uscat, furaje) se fărîmiţează (cu ajutorul foarfecelor) şi apoi se trece prin maşina de măcerat. Din pasta omogenă obţinută se cîntăresc în baloane de 100—150 ml probe a cîte 20 g. În cazul sucurilor vegetale se recoltează un volum egal cu 100 ml.

Extracţia carotenoizilor. Materialul se saponifică în prezenţa unei soluţii alcoolice de KOH 5% (20—40 ml) pe o baie de apă timp de 1 oră. După saponificare conţinutul balonului Erlenmeyer se răceşte şi se trece într-o pîlnie de separare, folosindu-se în acest scop 40—50 ml eter de petrol sau benzen şi 20—40 ml de apă distilată. Se agită energic şi după separare stratul superior care conţine solventul şi carotenoizii (eterul de petrol sau benzenul) se trece într-un pahar Berzelius curat, iar stratul inferior, care reprezintă soluţia alcoolică a hidroxidului de potasiu, este tratat în continuare cu eter de petrol sau benzen pînă la obţinerea unei soluţii per-

fect incolore. Reziduul din balonul Erlenmeyer, care rămîne după trecerea părţii lichide în pîlnia de separare, se spală de cîteva ori cu porţii mici de solvent (4—5 ml), care se adaugă la extractul carotenoizilor.

Extractul final de carotenoizi este spălat în pîlnia de separare cu apă distilată pînă cînd reacţia apelor de spălare devine neutră faţă de hîrtia de turnesol. Deshidratarea extractului se realizează cu sulfat de sodiu anhidru, conţinutul pîlniei de separare agitîndu-se pînă la dispariţia opalescenţei extractului. Sulfatul de sodiu se îndepărtează prin filtrare şi extractul carotenoizilor este evaporat pe o baie de apă pînă la un volum de 5—10 ml.

Cromatografierea extractului de carotenoizi. Extractul astfel obţinut se trece în coloana de MnO şi eluţia carotenoizilor se realizează cu eter de petrol sau cu benzen. Eluţia se consideră terminată cînd porţiile eluentului folosit sînt incolore.

Viteza de eluţie a coloanei nu trebuie să depăşească 50—60 picături pe minut (5 ml). De asemenea, se recomandă ca în timpul eluţiei să se urmărească dinamica pigmenţilor care însoţesc carotenoizii introduşi în coloană (de exemplu, licopina).

Soluţia de carotenoizi obţinută după cromatografiere se aduce la un volum exact, într-un balon cotat, cu solventul utilizat pentru eluţie. Un volum cunoscut de soluţie (10—15 ml) se trece în cuvele colorimetrului Duboscq şi se colorimetrează faţă de o soluţie etalon de bicromat de potasiu sau azobenzen.

Calcul. Un ml de soluţie standard de azobenzen corespunde ca intensitate a culorii la 0,00235 mg de carotenoizi (1 ml bicromat corespunde la 0,00208 mg de carotenoizi). Cantitatea de carotenoizi în soluţia de cercetat este calculată după formula:

$$X = \frac{0{,}00235 \cdot h_0 \cdot V \cdot 100}{h_1 \cdot g},$$

unde:

X este conţinutul, în mg%, de carotenoizi în materialul de cercetat;
h_0 — înălţimea soluţiei standard exprimată în mm;
h_1 — înălţimea soluţiei de cercetat citită pe scala colorimetrului şi exprimată în mm;
V — volumul total al soluţiei finale de carotenoizi, obţinut după cromatografiere pe coloană de MnO;
g — cantitatea de material vegetal iniţial recoltată pentru determinarea carotenoizilor, exprimată în g;
0,00235 — coeficient de calcul corespunzător cantităţii de carotenoizi, exprimată în mg, în cazul folosirii soluţiei etalon de azobenzen.

Cînd soluţia etalon folosită este bicromatul de potasiu, în formulă se introduce coeficientul corespunzător — 0,00208.

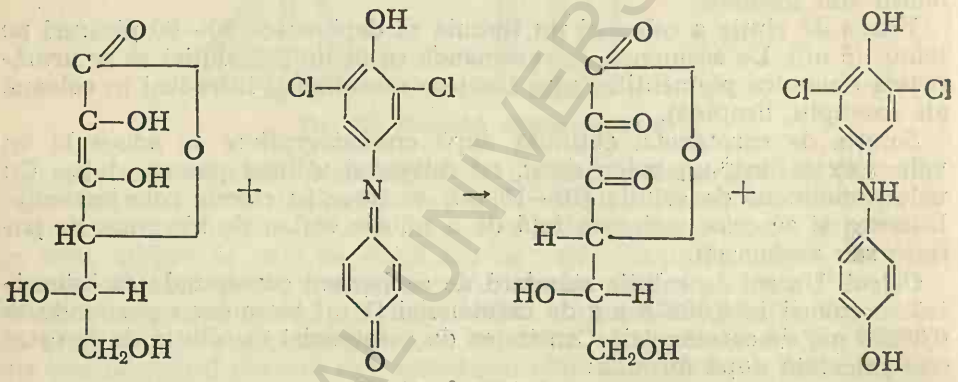
Importanţa practică a metodei. Carotenoizii sau provitaminele au o mare importanţă în alimentaţia omului şi furajarea animalelor. Dozarea lor cantitativă în alimente şi în furaje creează posibilitatea utilizării raţionale a materiei prime în industrie şi în zootehnie.

5.2.2. DETERMINAREA CANTITATIVĂ A ACIDULUI ASCORBIC

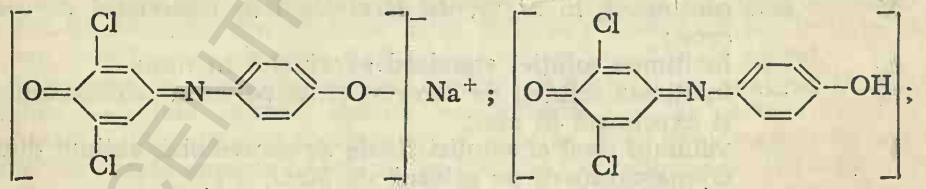
5.2.2.1. Metoda cu 2,6-diclorindofenol

Vitamina C este prezentă în ţesuturi sub formă de acid ascorbic, acid dehidroascorbic şi ascorbinogen — complex al vitaminei *C* cu proteinele. Vitamina *C* face parte din grupul vitaminelor acvosolubile (se dizolvă uşor în apă) şi este instabilă faţă de agenţii oxidanţi. În mediu acid, vitamina *C* este stabilă.

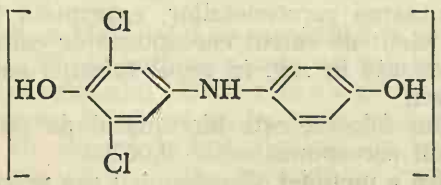
Principiul metodei. Acidul ascorbic reacţionează cu 2,6-diclorinodofenolul transformîndu-se în acid dehidroascorbic şi reducînd colorantul la leocoforma sa.[1]



Acidul ascorbic | 2, 6-diclor-indofenol (albastru) | Acid 1-dehidro-ascorbic | Leucoforma 2, 6-diclorindo-fenolului (incolră)



a) *b*)



c)

[1] 2,6-diclorindofenolul este colorat în albastru în mediu alcalin (*a*), în roşu în mediu acid (*b*) şi incolor (*c*) sub formă redusă.

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Reacția dintre acidul ascorbic și 2,6-diclorindofenol, cunoscută în literatură sub denumirea de reacția Tillman, nu este strict specifică, 2,6-diclorindofenolul fiind redus și de alte substanțe care au proprietăți reducătoare.

Reactivi necesari: 1) 2,6—diclorindofenol, soluție *N*/1 000. Se dizolvă 0,2 g de colorant în aproximativ 500—600 ml de apă dibistilată într-un balon cotat de 1 l. Soluția se agită energic și se lasă în repaus timp de 24 de ore la întuneric. Apoi soluția se filtrează și volumul ei se aduce la semn cu apă bidistilată. Se păstrează în sticle brune și se reface la fiecare 7 zile, deoarece cu timpul se degradează și nu mai poate fi utilizată din cauza titrului necorespunzător.

Titrul soluției se verifică înainte de efectuarea fiecărei determinări, folosindu-se în acest scop o cantitate bine definită (cîntărirea se face la balanța analitică) de acid ascorbic[1]; 2) Acid acetic, soluție 10%; 3) Cloroform.

Modul de lucru

Prepararea materialului vegetal pentru analiză. Într-un mojar se iau 40 ml soluție de CH_3COOH 10%. La balanța farmaceutică se cîntăresc 2 g de țesut vegetal (de exemplu, varză), se taie inoxidabil în bucăți, se introduce în mojar în soluția de acid acetic. (Mojararea probelor în mediu acid este necesară pentru a împiedica oxidarea acidului ascorbic de către enzima — ascorbinoxidaza —, prezentă în țesuturile vegetale.) Se adaugă nisip de cuarț (spălat cu acid clorhidric diluat și cu apă distilată) și proba este mojarată și filtrată.

Din filtratul obținut se iau două probe paralele a 4 ml fiecare și se titrează dintr-o microbiuretă cu soluție de 2,6-diclorindofenol *N*/1 000. Titrarea se execută repede pînă la obținerea unei colorații roz pal a soluției, care persistă 10 secunde.

Dozarea acidului ascorbic în urină. Urina normală are o culoare galbenă-deschis care variază, în funcție de ora recoltării, de la galben-pal spre galben-roșcat, din cauza substanțelor cromogene prezente în urină, ca: urocromul, urobilina, porfirina etc. Prezența unei colorații proprii prezintă dificultăți serioase, punctul de viraj în cazul titrării fiind greu sesizabil.

Pentru evitarea greșelilor experimentale se folosește cloroformul care extrage 2,6-diclorindofenolul din soluțiile apoase, permițînd aprecierea justă a punctului de viraj.

Se iau cu pipeta într-o eprubetă 5 ml de urină și 1 ml soluție de acid acetic, 10%, la care se adaugă 0,5 ml de cloroform. Conținutul eprubetei se agită cu grijă, în așa fel ca picăturile de cloroform să se adune pe fundul eprubetei. Proba se titrează dintr-o microbiuretă, picătură cu picătură, cu soluție de 2,6-diclorindofenol *N*/1 000. După fiecare picătură de

[1] Titrul soluției de 2,6—diclorindofenol poate fi stabilit și cu ajutorul sării lui Mohr, precum și cu soluții titrate de iodat de potasiu.

colorant, conținutul eprubetei se agită prudent pentru amestecarea acestuia cu urina și apoi se agită energic pentru amestecarea cloroformului cu urina. În momentul cînd cloroformul, după adăugarea unei picături de 2,6-diclorindofenol, se colorează ușor în roz pal, titrarea este terminată.

Calculul rezultatelor. Fie *f*, factorul soluției de 2,6-diclorindofenol egal cu 1,04 și 1,62 ml de colorat utilizat pentru titrarea probelor cu extract de vitamină obținut din varză.

$(1{,}62 \times 1{,}04) \times 0{,}088 \times 10 = 1{,}48$ mg acid ascorbic/2 g material

$1{,}48 \times 50 = 74$ mg/100 g material vegetal

0,088 — mg de acid ascorbic corespunzătoare la 1 ml soluție de 2,6-diclorindofenol *N*/1 000.

În cazul urinei, calculul rezultatelor se face la fel, rezultatul exprimîndu-se în mg%.

Exemplu:

$$(0{,}64 \times 1{,}04) \times 0{,}088 \times 20 = 1{,}34 \text{ mg\%}.$$

Observații. Vitamina *C* este larg răspîndită în regnul vegetal. Cantități însemnate de acid ascorbic se găsesc în ardei (170—280 mg%), ceapă (180—250 mg%) în fructele de trandafir sălbatic (1 000—2 290 mg%), cantitatea de vitamină variind în funcție de specie și varietate, precum și de perioada de vegetație.

Necesitățile organismului animal și uman în acid ascorbic variază în funcție de starea fiziologică a organismului. Organismul uman normal are nevoie de 30 mg de vitamină *C* în 24 de ore. Necesitatea organismului crește în stările patologice, travaliu muscular susținut etc.

Dozarea vitaminei *C* în urină este importantă în clinică pentru stabilirea consumului de vitamină *C* în cazul traumatismelor, bolilor infecțioase etc. Un consum excesiv de acid ascorbic este însoțit întotdeauna de o eliminare a acestuia din urină.

5.2.2.2. Metoda cu iodat de potasiu

Principiul metodei. Acidul ascorbic, extras cu ajutorul unei soluții de acid clorhidric, este dozat titrimetric cu ajutorul unei soluții de iodat de potasiu.

Reactivi necesari: 1) Acid clorhidric, soluție 1%; 2) Amidon, soluție 1% și 0,5%; 3) Iodat de potasiu, soluții *N*/10; *N*/100 și *N*/1 000; 4) Iodură de potasiu, soluție 1%.

Modul de lucru. Materialul în care urmează să se dozeze vitamina *C* (25 g de cartofi, 200 g de fructe sau de material verde, 10 ml de centri-

fugat, filtrat, suc) se mojarează (sau amestecă) într-un mojar în prezența a 10 ml soluție de HCl, 1%. Se notează volumul final (în ml) al extractului acidulat. Din extractul acidulat se recoltează cu o pipetă probe a cîte 5—10 ml (în funcție de cantitatea de acid ascorbic prezentă în extract), care se introduc în baloane Erlenmeyer (de 50—100 ml) peste 0,5 ml soluție de KI 1%, 2 ml soluție de amidon 0,5 și 2 ml de apă distilată. Amestecul după agitare se diluează cu apă distilată la un volum final de 15 ml și se titrează cu soluție de KIO_3 *N*/1 000, dintr-o microbiuretă, pînă la obținerea unei colorații albastre care apare la prima picătură de KIO_3 în exces.

Proba martor constă din 0,5 ml soluție de KI 1%, 2 ml soluție de amidon 0,5%, 1 ml soluție de HCl 2% și apă distilată pînă la un volum final de 15 ml. Se titrează cu soluție de KIO_3 *N*/1 000.

Calculul rezultatelor. Cantitatea de acid ascorbic se calculează după formula:

$$A = \frac{(a-b) \times f \times c \times 0{,}088 \times 100}{d \times g} = \text{mg}\%,$$

unde:

A este cantitatea de acid ascorbic, exprimată în mg%;
a — volumul de soluție de KIO_3 *N*/1 000, utilizat pentru titrarea probei cu extract vegetal;
b — volumul de soluție de KIO_3 *N*/1 000 folosit pentru titrarea probei martor;
f — factorul soluției de KIO_3 *N*/1 000;
c — volumul inițial al extractului (ml), realizat cu ajutorul HCl;
d — volumul de extract luat pentru titrare (ml);
g — cantitatea de material din care a fost obținut extractul.

5.2.3. DETERMINAREA VITAMINEI *E*

Principiul reacției. Vitamina *E* (în soluție) în prezența acidului azotic formează un complex colorat în roșu, ceea ce permite dozarea ei cantitativă pe cale colorimetrică.

Reactivi necesari: 1) Hidroxid de sodiu, soluție 20%; 2) Acid azotic concentrat; 3) Eter etilic, p.a.; 4) Sulfat de sodiu anhidru; 5) Pirogalol, soluție 5%, preparată în alcool; 6) Dicloretan, distilat și deshidratat cu Na_2SO_4; 7) Soluție standard. În 52 ml de alcool etilic 96° se dizolvă 20 mg de albastru de bromtimol și 0,4 mg de fuxină. Se iau 2 ml din această soluție și se aduc la 50 ml cu alcool etilic (1 ml soluție corespunde la 0,12 mg de vitamină *E*); 8) Al_2O_3 activat. Preparatul este încălzit la 700°C, timp de 3 ore și ulterior trecut printr-o sită pentru uniformizare.

Modul de lucru. Din materialul de analizat (grîu, legume, fructe etc.) se iau 5 g, la care se adaugă 10 ml soluție de NaOH 20% și 5 ml soluție

de pirogalol 5%. Amestecul este saponificat pe o baie de apă, timp de 30 de minute. Prezența pirogalolului în soluție preîntîmpină hidroliza vitaminei *E* în timpul saponificării.

Conținutul balonului se trece cantitativ cu ajutorul a 20—25 ml de apă distilată fierbinte într-o pîlnie de separare și este extras de 3 ori cu cîte 25 ml de eter etilic, care nu conține peroxizi. Extractele eterice sînt colectate și reunite, amestecul spălîndu-se în final cu apă distilată pînă la reacție neutră față de hîrtia de turnesol a apelor de spălare. Eterul etilic cu care au fost extrași tocoferolii este filtrat printr-un filtru de hîrtie obișnuită în care se introduc 2—3 g de Na_2SO_4. Filtrul și Na_2SO_4 sînt spălate după filtrare cu 10 ml de eter sulfuric și filtratul reunit cu cel precedent. Eterul etilic este îndepărtat prin distilarea extractului pe o baie de apă la 40°C, într-un curent de CO_2 sau N_2.

Reziduul rezultat după distilarea eterului etilic se dizolvă în 10 ml de dicloretan. Soluția se aplică pe o coloană de Al_2O_3 și după adsorbție este eluată cu dicloretan.

Prepararea coloanei cromatografice de Al_2O_3. Într-o coloană cromatografică, de mărimea celei utilizate pentru separarea carotenoizilor, se introduce 10 g de Al_2O_3, suspensie în dicloretan, și coloana se lasă în repaus timp de 1 oră pentru completa sedimentare a adsorbantului. Deasupra stratului de Al_2O_3 se păstrează întotdeauna un volum mic (3—4 ml) de solvent.

Se aplică pe coloană extractul de analizat, evitîndu-se agitarea adsorbantului și se adaugă 10 ml de dicloretan. Eluarea coloanei se face pînă în momentul cînd volumul final al eluatului este de 50 ml.

Dicloretanul este distilat pe o baie de apă într-un curent de bioxid de carbon sau de azot și reziduul rezultat se dizolvă în 5 ml de alcool etilic. În balonul cu reziduul dizolvat se adaugă 1 ml de HNO_3 concentrat, balonul se conectează la un refrigerent și conținutul lui se încălzește timp de 3 minute pe o baie de apă în clocot. După 3 minute soluția se răcește într-un curent de apă de robinet, volumul lichidului din balon se aduce la 5 ml cu alcool etilic și se colorimetrează, folosind ca martor 5 ml de soluție etalon.

Calculul rezultatelor. Cantitatea de vitamină *E* în probă se calculează după formula:

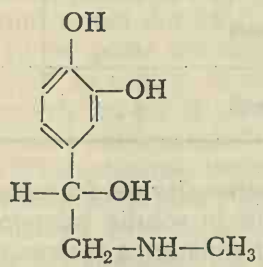
$$x = \frac{h_0 \times 0{,}12 \times 100}{h_1 \times 5} = \text{mg\% tocoferol.}$$

Observații. Extractul de vitamină *E* este adesea colorat datorită prezenței pigmenților vegetali, fapt care creează dificultăți în dozarea cantitativă, deoarece eluatele conțin pe lîngă tocoferol și pigmenți. În aceste cazuri se recomandă cromatografierea extractului pe coloane suprapuse care adsorb selectiv pigmenții și tocoferolul (exemplu, coloane de Al_2O_3 și diatomit).

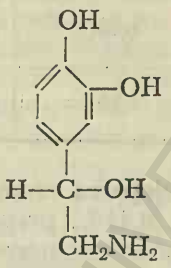
BCU / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

5.2.4. SEPARAREA ADRENALINEI ȘI NORADRENALINEI CU AJUTORUL CROMATOGRAFIEI PE HÎRTIE. METODA SHEPHERD, WEST, JAMES

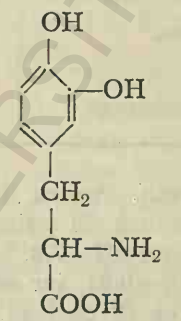
Principiul reacției. **Adrenalina, noradrenalina și dihidroxifenilalanina reacționează cu fericianura de potasiu, în mediu alcalin, formînd pe hîrtia cromatografică spoturi diferit colorate și vizibile în lumină ultravioletă.**



Adrenalină



Noradrenalină



Dihidroxifenilalanină (DOPA)

Reactivi necesari: 1) n-Butanol — acid acetic — apă (4 : 1 : 5 vol/vol); 2) — Fericianură de potasiu, soluție 0,66%; 3) Formol, soluție 40%; 4) Amestec de adrenalină, noradrenalină și dihidroxifenilalanină (se conservă în flacoane de culoare închisă!) sau 5) Extract al glandelor suprarenale ale șobolanului.

Modul de lucru. Se aplică pe o bandă cromatografică, confecționată din hîrtie cromatografică Whatmann nr. 1, extractul suprarenal sau un amestec hormonal care urmează să fie separat în componentele corespunzătoare. Pe aceeași bandă cromatografică se aplică, de asemenea, și soluțiile martor de adrenalină, noradrenalină și dihidroxifenilalanină.

Separarea componentelor amestecului (sau extractului examinat) se efectuează cu n-butanol-acid acetic-apă, amestec în proporții de 4 : 1 : 5. Cromatogramele se usucă la temperatura camerei și ulterior sînt pulverizate dintr-un dispozitiv adecvat, cu un amestec format din 9 ml de fericianură de potasiu 0,66% și 1 ml de formol 40%. După pulverizare cromatogramele se introduc pentru 5 minute într-un termostat reglat la temperatura de 100°C și ulterior sînt examinate în lumină ultravioletă,[1] notîndu-se cu un creion cu grafit negru conturul spoturilor și separat colorația fiecărui spot identificat.

Valorile *Rf* și concentrațiile minime ale componentelor care dau o reacție și spoturi perfect vizibile în ultraviolet sînt redate în tabela 29.

[1] Este absolut obligatoriu ca persoana care examinează cromatogramele în lumină ultravioletă să poarte ochelari de protecție pentru a evita arsurile.

Tabela 29

Valorile *Rf* şi fluorescenţa spoturilor de adrenalină, noradrenalină şi dehidroxifenilalanină în lumină ultravioletă

Denumirea compusului analizat	Concentraţia minimă (μg) necesară pentru identificare	Fluorescenţa spotului în lumină ultravioletă	Valorile *Rf* ale spoturilor
Adrenalină	0,40	galbenă-verde	0,36
Noradrenalina	0,20	albastră	0,28
Dihidroxifenilalanină	0,10	galbenă	0,19

Observaţii. Pentru developarea cromatogramelor se foloseşte şi soluţia de fericianură de potasiu 0,44%, preparată în soluţie tampon de fosfaţi 0,2 *M*, cu un *p*H=7,8. În acest caz, noradrenalina are o fluorescenţă brună-roşie şi *Rf*=0,21, iar adrenalina formează spoturi colorate în roşu aprins, cu valoarea *Rf* de 0,44.

5.2.5. DETERMINAREA 17-CETOSTEROIZILOR TOTALI DIN URINĂ. METODA COHEN şi SALTER.

Principiul metodei. Esterii hormonilor cetosteroizi prezenţi în urină sînt hidrolizaţi şi extraşi cu eter etilic. Reziduul extractului eterat se utilizează pentru dozarea 17-cetosteroizilor, care în mediu alcalin în prezenţa unei soluţii de metadinitrobenzen în alcool colorează soluţia în roşu. Intensitatea coloraţiei este direct proporţională cu cantitatea de cetosteroizi în eşantionul analizat.

Reacţia cetosteroizilor cu metadinitrobenzenul este cunoscută şi sub numele de *reacţia lui* Zimmerman.

Reactivi necesari: 1) Alcool etilic absolut; 2) Eter etilic. Se tratează eterul etilic cu sulfat de sodiu anhidru, timp de 24 de ore şi se distilă; 3) Acid clorhidric concentrat, *d*=1,19; 4) Reactiv Zimmerman. Se dizolvă 2 g de metadinitrobenzen în 100 ml de alcool etilic absolut. Pentru obţinerea unor rezultate corespunzătoare este necesară purificarea prealabilă a metadinitrobenzenului. În acest scop se dizolvă într-un pahar Berzelius 5 g de metadinitrobenzen în 190 ml alcool etilic. Soluţia se încălzeşte pe o baie de apă la 40°C şi în acest timp se adaugă 20 ml soluţie de NaOH 4%. La 5 minute de la adăugarea hidroxidului de sodiu se aduce volumul soluţiei la 750 ml cu apă distilată şi se agită. După conservarea în frigider timp de cîteva ore, soluţia se filtrează la vid. Substanţa reţinută pe filtru se usucă pe hîrtie de filtru la temperatura camerei şi ulterior în exicator,

sub vacuum. Se conservă în flacoane de culoare brună; 5) Hidroxid de potasiu, soluție alcoolică titrată 2,5 *N*; 6) Hidroxid de sodiu, soluție 4%; 7) Fenolftaleină, soluție 2% alcoolică; 8) Acid clorhidric, soluție 2,5 *N*; 9) Soluție-stoc de cis-androsteronă în alcool etilic absolut. Un ml soluție trebuie să conțină 100μg de cis-androsteronă. Soluția se conservă în frigider și se reface după fiecare 6 săptămîni. În momentul utilizării, pentru obținerea curbei etalon, soluția-stoc se diluează cu alcool etilic absolut în proporție de 1 : 1.

Modul de lucru

Colectarea și prepararea eșantioanelor de urină. Urina colectată timp de 24 de ore în prezența a 10 ml de acid clorhidric este conservată la rece. Dacă volumul urinei din 24 de ore este mai mic de 800 ml, dozarea cetosteroizilor nu se poate efectua. Esterii 17-cetosteroizilor prezenți în urină sînt hidrolizați la cald și în mediu acid. În acest scop, într-un balon de 350 ml, prevăzut cu șlif și un refrigerent cu reflux, se măsoară 100 ml de urină acidificată cu acid clorhidric concentrat (sînt necesari aproximativ 15 ml de HCl concentrat, inclusiv volumul de acid adăugat înainte de recoltarea urinei). Conținutul balonului se încălzește la fierbere 10 minute, pe o baie de apă și se răcește ulterior într-un curent de apă de robinet.

Extracția 17-cetosteroizilor din hidrolizatul urinei. Hidrolizatul se filtrează într-o pîlnie de separare (volumul pîlniei 150 ml) și balonul la care s-a efectuat hidroliza se spală cu volume mici de apă distilată care se trec pe filtru. La filtrat se măsoară cu pipeta 50 ml de eter etilic și amestecul se agită 3 minute. Stratul inferior apos se separă într-o nouă pîlnie de separare și se tratează din nou cu 50 ml eter etilic. Cele două extracte eterice se reunesc, în final, într-o singură pîlnie de separare, spălîndu-se atent pîlnia cu eter etilic, pentru trecerea cantitativă a extractului. Extractele reunite sînt tratate de 2 ori cu cîte 40 ml de hidroxid de sodiu, soluție 4% și apoi spălate cu apă distilată (de 3 ori cu cîte 20 ml de H_2O distilată). Scopul ultimei operații este îndepărtarea completă a hidroxidului de sodiu și a cromogenilor urinari. După fiecare operație de spălare și de adăugare de reactivi, pîlnia de separare se agită, se lasă în repaus pentru separarea distinctă a celor două straturi și faza inferioară se elimină.

Extractul eteric final se trece cantitativ într-un balon de la o instalație de distilare, în care scop pîlnia de separare se spală de 2—3 ori cu mici volume de eter etilic. Eterul etilic este distilat pînă cînd volumul extractului eteric final este redus la 8—10 ml. Extractul eteric din balonul de distilat se trece cantitativ într-un balon Erlenmeyer și se evaporă la sec sub nișă pe o baie de apă. În reziduu se dozează 17-cetosteroizii. Dacă dozarea cetosteroizilor nu se face imediat se recomandă conservarea reziduului la temperatură scăzută și cel mult 10—12 ore.

Pregătirea probelor pentru citirea la colorimetru. Reziduul uscat este dizolvat în 4 ml de alcool etilic absolut. Se recoltează din soluția rezultată trei probe a 0,2 ml și se adaugă reactivii menționați în tabela 30.

Tabela 30

Obținerea curbei etalon pentru determinarea cantitativă a 17 — cetosteroizilor în urină

Reactivi	Proba						
	1	2	3	4	5	6	7
Soluție etalon de cis-androsteronă (ml)	0,25	0,50	0,75	1,00	1,25	1,50	0,00
Alcool etilic absolut (ml)	—	—	—	—	—	—	1,50
Probele etalon sînt evaporate la sec sub nișă pe o baie de apă							
Alcool etilic absolut (ml)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Metadinitrobenzen (ml)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Hidroxid de potasiu, soluție 2,5 *N* (ml)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Probele sînt lăsate în repaus 60 de minute la temperatura camerei și în întuneric							
Alcool etilic absolut (ml)	5	5	5	5	5	5	5
Concentrația cis-androsteronei în probă (μg)	12,5	25	37,5	50	62,5	75	0
Valorile *E* citite la fotoelectrocolorimetrul Pulfrich (model orizontal VSU_1)	0,075	0,186	0,285	0,371	0,474	0,563	

Probele 1, 2 și 3 se citesc la fotocolorimetrul Pulfrich, folosind cuva de 1 cm și filtrul S_{53} (633 mμ), utilizînd ca soluție martor proba 4. Proba 3 corespunde unei culori parazite, care rezultă după dizolvarea reziduului de 17-cetosteroizi în alcool etilic absolut.

Calculul rezultatelor. Valorile extincției (*E*) obținute pentru probele 1, 2 și 3 se citesc în curba etalon realizată cu ajutorul soluției diluate de cis-androsteronă, folosindu-se o serie de diluții și tratîndu-se pe material conform indicațiilor din tabelul 31. Probele etalon sînt citite la fotocolorimetrul Pulfrich și curba etalon construită după procedeele descrise, în principiu, în capitolele anterioare. Valorile *E* ale celor trei probe se citesc pe curba etalon (în μg de cis-androsteronă). Se face diferența dintre media aritmetică a probelor 1, 2 și 3, valoarea obținută reprezentînd cantitatea de 17-cetosteroizi din 5 ml de urină. Se calculează cantitatea 17-cetosteroizilor în 100 ml de urină și rezultatul, exprimîndu-se în mg, se raportează la volumul total al urinei recoltată în 24 de ore.

Valoarea diagnostică. Cantitatea 17-cetosteroizilor în urina din 24 de ore variază ușor în funcție de vîrsta pacientului. Astfel, la bărbați între 17 și 75 de ani, în urina din 24 de ore se găsesc între 8(4) și 28(17) mg de 17-cetosteroizi (în paranteză valorile minime).

Tabela 31

Prepararea eşantioanelor din reziduul 17-cetosteroizilor urinari

Reactivi	Proba nr.			
	1	2	3	4
Soluţie alcoolică a reziduului (ml)	0,2	0,2	0,2	0,0
Alcool etilic absolut (ml)	—	—	—	0,2
Probele sînt evaporate la sec sub nişă pe o baie de apă				
Alcool etilic absolut (ml)	0,1	0,1	0,1	0,1
Reactiv Zimmerman (ml)	0,1	0,1	—	0,1
Hidroxid de potasiu, soluţie 2,5 *N* în alcool (ml)	0,1	0,1	0,1	0,1
Probele sînt lăsate în repaus 60 de minute la temperatura camerei şi la întuneric				
Alcool etilic absolut (ml)	5	5	5	5

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

CAPITOLUL 6

ELEMENTE MINERALE

„Descoperirea microelementelor și a rolului lor fiziologic constituie una din cele mai frumoase pagini din istoria biologiei..."

UNDERWOOD, E. J.

6.1. NOȚIUNI GENERALE

Elementele minerale au un rol important în metabolismul organismelor vii. În general, toate stările patologice acute ale organismului animal sînt însoțite de perturbări ale metabolismului apei și electroliților.

În plasma sanguină a adultului normal, elementele minerale se găsesc sub formă de cationi (Na^+, K^+, Ca^{++} și Mg^{++}) și anioni (Cl^-, HCO_3^-, HPO_4^{--} și SO_4^{--}), determinarea lor cantitativă avînd o semnificație clinică, care în ultimul timp se conturează din ce în ce mai precis.

Electroliții sînt eliminați din organismul animal prin secreția sudorală, prin rinichi și la nivelul tubului digestiv (salivă, suc gastric, bilă, suc pancreatic, secreție intestinală). Reglarea bilanțului apei și electroliților este influențată de sistemele nervos și endocrin.

O importanță deosebită se acordă în prezent utilizării în agricultură a îngrășămintelor, care pe lîngă azot, fosfor și potasiu conțin în cantități suficiente și alte microelemente: molibden, vanadiu, cupru, fier, mangan, bor, cobalt, zinc etc. Ridicarea productivității animalelor domestice este strîns legată de asigurarea unui conținut optim de microelemente în furaje. În acest sens este semnificativă folosirea pe scară largă a compușilor cobaltului, iodului și cuprului în zootehnie, lucru care s-a dovedit o măsură eficace.

Metabolismul unor elemente minerale este controlat de diferiți factori. Astfel, de exemplu, absorbția calciului alimentar în organism este controlată de vitamina *D*, depozitarea fosforului în oase este dirijată de o enzimă — fosfataza alcalină etc. Microelementele îndeplinesc, de asemenea, și rolul de activatori, influențînd activitatea diferitelor enzime.

BCU CLUJ UNIVERSITY LIBRARY

6.2. ANALIZA CANTITATIVĂ

6.2.1. DETERMINAREA CALCULULUI SANGUIN METODA DE WAARD

Principiul metodei. Calciul din ser reacționează cu oxalatul de amoniu formînd un precipitat alb, insolubil în apă și amoniac, însă ușor solubil în mediu acid (1):

$$CaCl_2 + \begin{matrix} COONH_4 \\ | \\ COONH_4 \end{matrix} \rightarrow \begin{matrix} COO \\ | \\ COO \end{matrix}\!\!>\!Ca + 2NH_4Cl. \qquad (1)$$

Precipitatul alb de oxalat de calciu se spală cu apă distilată și amoniac pentru îndepărtarea excesului de oxalat de amoniu și ulterior se dizolvă în acid sulfuric (2):

$$\begin{matrix} COO \\ | \\ COO \end{matrix}\!\!>\!Ca + H_2SO_4 \rightarrow \begin{matrix} COOH \\ | \\ COOH \end{matrix} + CaSO_4. \qquad (2)$$

Acidul oxalic rezultat se titrează la cald și în mediu acid cu permanganat de potasiu (3):

$$5 \begin{matrix} COOH \\ | \\ COOH \end{matrix} + 2KMnO_4 + 3H_2SO_4 \rightarrow 10CO_2 + 2MnSO_4 + K_2SO_4 + 8H_2O. \qquad (3)$$

Reactivi necesari: 1) Oxalat de amoniu, soluție saturată; 2) Permanganat de potasiu, soluție *N*/100; 3) Acid oxalic, soluție *N*/100; 4) Acid sulfuric, soluție 50%.

Modul de lucru. În două eprubete de centrifugă de Waard se introduc cîte 1 ml ser sanguin proaspăt obținut prin centrifugarea sîngelui și 0,5 ml de soluție saturată de oxalat de amoniu. Conținutul eprubetelor se agită energic și se lasă în repaus 15 minute, apoi probele sînt centrifugate timp de 5—10 minute la 3 000—4 000 turații/minut și partea alicotă se decantează cu grijă cu ajutorul unei pipete cu bulă.

Pentru îndepărtarea excesului de oxalat de amoniu prezent în mediul de reacție, precipitatul obținut se spală de 3 ori cu cîte 2 ml apă distilată și de fiecare dată partea alicotă se decantează prin sifonare. Înaintea fiecărei centrifugări, reactivul adăugat și precipitatul rezultat după centrifugarea anterioară sînt agitate cu ajutorul unei baghete de sticlă, care după fiecare folosire se spală cu 2—3 ml de apă distilată, apele de spălare adăugîndu-se la conținutul eprubetei.

La precipitatul obținut după ultima centrifugare se adaugă 0,5 ml soluție de H_2SO_4 50% și conținutul eprubetelor se încălzește pe o baie de apă, la

temperatura de 60—80°C. Soluția rezultată după dizolvarea completă a precipitatului se titrează cu $KMnO_4$, *N*/100 pînă la apariția unei colorații roz pal care persistă timp de 1 minut. Titrarea se efectuează la cald și cu ajutorul unei microbiurete.

Determinarea titrului soluției de permanganat de potasiu. Într-un balon Erlenmeyer se pun cu pipeta 2 ml de acid oxalic, soluție *N*/100, 0,5 ml de H_2SO_4, soluție 50%. Conținutul balonului se încălzește la 70—80°C pe o baie de apă și se titrează cu $KMnO_4$ *N*/100 pînă la apariția culorii roz pal, care persistă 40—60 secunde.

Calculul rezultatelor. Cantitatea de soluție de $KMnO_4$ (exprimată în ml) utilizată pentru titrarea probelor cu ser se înmulțește cu 0,2 și cu 100, concentrația calciului exprimîndu-se astfel în mg%.

Coeficientul 0,2 utilizat pentru calcul se explică prin faptul că pentru oxidarea a 5 molecule acid oxalic care au fost combinate cu 5 atomi de calciu sînt necesare 2 molecule de $KMnO_4$ (v. ecuația 3). În consecință, cele 2 molecule de $KMnO_4$ au pus în libertate 5 atomi de oxigen și deci soluția normală de $KMnO_4$ conține 1/5 din molecula acestuia. Rezultă deci, că 1 ml soluție de $KMnO_4$ *N*/100 corespunde la 0,01 miliechivalenți de calciu.

Calciul are greutatea atomică 40 și este bivalent. Deci, o soluție de calciu *N*/100 conține:

$$\frac{40:2}{100}=0{,}2 \text{ mg calciu.}$$

Exemplu de calcul. Fie 0,56 ml de $KMnO_4$, soluție *N*/100, folosiți pentru titrare și 0,95 factorul acestei soluții. Empiric s-a stabilit că aproximativ 0,02 ml soluție de $KMnO_4$ *N*/100 sînt utilizați pentru colorarea volumului de soluție finală. Cantitatea de calciu exprimată în mg% va fi egală cu:

$$(0{,}056\times0{,}95)-0{,}02\times0{,}2\times100=10{,}24 \text{ mg\%}.$$

Observație. Din volumul total de permanganat utilizat pentru titrare trebuie să se scadă 0,02 ml consumați pentru colorarea soluției în roz.

Valoare diagnostică. Cantitatea de calciu în plasma sanguină este aproximativ constantă în condiții normale și variază între 9,5 și 10,5 mg%. Numai jumătate din cantitatea totală de calciu din plasmă se găsește sub formă ionizată, restul fiind combinată cu proteinele plasmatice. Paratiroida controlează și reglează concentrația calciului plasmatic. În adenomul paratiroidian, concentrația calciului ajunge pînă la 18%. Hipercalcemia provoacă tetanii, hipocalcemia, oprirea cordului. Adsorbția Ca alimentar este controlată de vitamina *D*.

6.2.2. DETERMINAREA SODIULUI ÎN SERUL SANGUIN. METODA RONA ȘI KLEINMANN

Principiul metodei. Sodiul este precipitat în mediu alcoolic sub formă de $Na_2H_2Sb_2O_7$, sare insolubilă care, după îndepărtarea excesului de reactiv ($K_2H_2Sb_2O_7$) prin spălare repetată a precipitatului, se dizolvă în

acid clorhidric. Stibiul pentavalent prezent în precipitat este redus de iodura de potasiu la stibiu trivalent, iar iodul eliberat se titrează cu tiosulfat de sodiu.

Reacţiile care au loc decurg după ecuaţiile 1—4:

$$K_2H_2Sb_2O_7 + 2NaCl = Na_2H_2Sb_2O_7 + 2KCl \quad (1)$$

$$Na_2H_2Sb_2O_7 + 12HCl = 2NaCl + 2SbCl_5 + 7H_2O \quad (2)$$

$$2SbCl_5 + 4KI = 2SbCl_3 + 4KCl + 2I_2 \quad (3)$$

$$2I_2 + 4Na_2S_2O_3 = 2Na_2S_4O_6 + 4NaI \quad (4)$$

Reactivi necesari: 1) Piroantimoniat de potasiu, soluţie alcalină. Într-un balon Erlenmeyer din sticlă Jena cu o capacitate de 1 l se încălzesc la fierbere 500 ml de apă distilată, în care se adaugă în cantităţi mici, în repetate rînduri, 10 g de piroantimoniat de potasiu. Soluţia se agită după adăugarea piroantimoniatului de potasiu şi se încălzeşte din nou la fierbere timp de 3—4 minute. Conţinutul balonului Erlenmeyer se răceşte într-un curent de apă de robinet şi după aceea la soluţia rece se adaugă 15 ml de soluţie KOH 10% (! este contraindicată utilizarea soluţiei de hidroxid de sodiu). Soluţia alcalină de piroantimoniat de potasiu este filtrată într-un flacon de sticlă parafinat pe dinăuntru şi prevăzut cu dop rodat.

Piroantimoniatul de potasiu astfel preparat poate fi utilizat după 24 de ore de la preparare.

2) Alcool etilic 96%; 3) Alcool etilic, soluţie 30%; 4) Acid clorhidric concentrat (d=1,19); 5) Iodură de potasiu, soluţie 20% (se pregăteşte înainte de utilizare); 6) Amidon, soluţie 1%; 7) Tiosulfat de sodiu, soluţie N/10 şi N/20; 8) Bicromat de potasiu, soluţie N/10.

Modul de lucru. Sîngele proaspăt recoltat este centrifugat pentru obţinerea serului sanguin. Se iau două probe paralele a cîte 0,3—0,5 ml de ser sanguin în două eprubete Jena şi volumul lor se completează pînă la 1 ml cu apă distilată. Paralel se pregăteşte şi o probă martor, în care în loc de ser sanguin se adaugă o cantitate egală de apă distilată. Se adaugă apoi 5 ml de $K_2H_2Sb_2O_7$ şi imediat dintr-o biuretă, picătură cu picătură, 1,5 ml de alcool 96°; amestecul se agită tot timpul cu o baghetă de sticlă. Bagheta de sticlă se spală deasupra eprubetei cu cîteva picături de alcool 30% şi după aceea se păstrează într-un balon Erlenmeyer din sticlă Jena.

Eprubetele sînt echilibrate două cîte două cu ajutorul soluţiei de alcool 30%, la balanţa pentru centrifugă şi timp de 45 de minute se introduc într-o baie de apă cu gheaţă. După 45 de minute, eprubetele sînt scoase din baia de gheaţă, şterse de apă şi centrifugate timp de 5 minute la 3 000—4 000 turaţii/minut. După centrifugare partea alicotă este îndepărtată prin sifonare cu ajutorul unei pipete cu bulă, şi la precipitatul obţinut se adaugă 2 ml soluţie de alcool etilic 30%, care a fost ţinută la rece şi probele sînt din nou centrifugate. Se repetă de 2 ori operaţia de spălare cu alcool etilic şi centrifugare.

După ultima îndepărtare a alcoolului etilic în probe se adaugă, dintr-o biuretă şi sub nişă, 5 ml de HCl concentrat, se agită cu bagheta şi conţi-

nutul fiecărei eprubete se trece cantitativ în cîte un balon Erlenmeyer. Eprubetele de centrifugă în care au fost probele se spală de 2 ori cu cîte 5 ml de apă distilată, apele de spălare trecîndu-se în baloanele Erlenmeyer, corespunzătoare probelor.

Se prepară 10 ml soluție de KI 20%. În fiecare probă și în proba martor se adaugă cîte 2 ml soluție de KI 20%. Toate probele (martorul și probele cu ser) se titrează cu $Na_2S_2O_3$ soluție $N/10$ pînă la apariția culorii galbene, după care se adaugă 3—4 picături soluție de amidon 1% și titrarea se continuă pînă la decolorarea totală a probelor.

Determinarea echivalentului în sodiu pentru soluția de $K_2H_2Sb_2O_7$. În două baloane Erlenmeyer se măsoară cu pipeta exact (!) cîte 2 ml soluție alcalină de $K_2H_2Sb_2O_7$, la care se adaugă 15 ml de apă distilată, 5 ml de HCl concentrat și 2 ml de KI 20%. Se titrează cu soluție $Na_2S_2O_3$ $N/20$ pînă la dispariția culorii albastre. Se calculează echivalentul în sodiu al soluției de $K_2H_2Sb_2O_7$ după formula:

$$\frac{N \times 5 \times 0{,}575}{2} = \text{mg echivalent de Na în 5 ml de reactiv, } K_2H_2Sb_2O_7$$

unde:

N este numărul de ml $Na_2S_2O_3$ utilizați pentru titrare;
2 — ml de soluție alcalină de $K_2H_2Sb_2O_7$ luați pentru titrare;
0,575 — coeficientul de echivalență pentru Na;
5 — echivalentul se calculează pentru 5 ml reactiv.

Echivalentul soluției alcaline de $K_2H_2Sb_2O_7$ calculat pentru 5 ml de reactiv nu trebuie să fie mai mic de 4,8—4,7 mg Na.

Verificarea titrului soluției de tiosulfat (exprimat în echivalenți de sodiu). În două baloane Erlenmeyer se iau (cu pipeta) cîte 2 ml soluție de $K_2Cr_2O_7$ $N/10$, 5 ml de HCl concentrat, 10 ml de apă distilată și 2 ml soluție KI 20%. Amestecul se titrează cu soluție de $Na_2S_2O_3$ $N/10$ pînă la apariția culorii galbene, cînd se adaugă 2—3 picături soluție amidon 1% și titrarea se continuă pînă la dispariția culorii albastre.

Calcul. Patru molecule de tiosulfat corespund la 2 echivalenți de sodiu (reacțiile 1—4), iar un echivalent de $Na_2S_2O_3$ este egal cu 0,5 echivalenți de sodiu, de unde:

$$Na = \frac{23}{2} = 11{,}5,$$

deci un ml soluție de $Na_2S_2O_3$ $N/10$ corespunde la 1,15 mg Na.

Un echivalent de iod corespunde de asemenea la 0,5 echivalenți de sodiu, de unde se poate deduce că:

$$\frac{N \times \text{titru} \times 115}{N'} = \text{mg Na la 100 ml.}$$

Exemplu. Fie 0,5 ml ser luat pentru analiză, 2 ml soluție de $Na_2S_2O_3$ *N*/10 utilizați pentru titrare, iar factorul soluției de $Na_2S_2O_3$ este 1,08. Cantitatea de Na, exprimată în mg%, va fi egală cu:

$$\frac{1,15 \times 1,08 \times 2 \times 100}{0,5} = 497 \text{ mg\%}.$$

Valoarea diagnostică. În mod normal, cantitatea de sodiu în serul sanguin al pacienților sănătoși este de 320—330 mg%. Cantități însemnate de sodiu, de asemenea, pot fi identificate în cartilaje (328 mg%), în schelet (138 mg%), în nervi (244 mg%), în mușchi (120 mg%), în inimă (100 mg%), în ficat, dinți, emisfere cerebrale (86—124 mg%), în sucul gastric, sucul pancreatic și intestinal, în bilă etc. Sodiul provine în organismul animal din alimentație, unde se folosește sub formă de NaCl. În cazul afecțiunilor renale, cantitatea de NaCl ingerată de bolnav trebuie redusă la strictul necesar, abuzul fiind contraindicat. Sînt și maladii în care lipsa de NaCl în alimentație poate provoca decesul bolnavului, de exemplu, boala lui Addison.

6.2.3. DETERMINAREA POTASIULUI ÎN SERUL SANGUIN. METODA KRAMER ȘI TISDALL

Principiul metodei. Potasiul este precipitat din serul sanguin nediluat prin adăugarea unui exces de hexanitrocobaltiat trisodic la un *p*H mai ridicat decît punctul izoelectric al proteinelor din ser care rămîn în soluție, reactivul precipitînd exclusiv potasiul (reacția 1):

$$Na_3[Co(NO_2)_6] + 2KCl = 2NaCl + K_2Na[Co(NO_2)_6]. \qquad (1)$$

Reacția în probele de analizat nu decurge exact după ecuația (1), deoarece paralel se formează și hexanitrocobaltiatul tripotasic $K_3[Co(NO_2)_6]$.

Reactivi necesari: 1) Reactiv pentru potasiu: (*A*) — Se dizolvă 25 g de nitrat de cobalt în 50 ml de apă distilată, la care se adaugă 12,5 ml de acid acetic glacial. (*B*) — În 180 ml de apă distilată se dizolvă 120 g de nitrat de sodiu, care nu conține urme de potasiu. La soluția (*A*) luată în întregime se adaugă 210 ml de soluție (*B*) și amestecul se barbotează timp de 5 minute. Reactivul pentru potasiu se păstrează la 0°C și se filtrează de fiecare dată înainte de utilizare. După 30 de zile, reactivul se reface; 2) Permanganat de potasiu, soluție *N*/100; 3) Acid oxalic, soluție *N*/100; 4) Acid sulfuric, soluție 50%.

Modul de lucru. Serul sanguin se obține din sîngele proaspăt recoltat. Se recomandă centrifugarea imediată, deoarece masa principală a potasiului se găsește în eritrocite. În timpul conservării sîngelui, potasiul trece din eritrocite în plasmă.

Se ia în două eprubete de centrifugă cîte 1 ml de ser, 2 ml de reactiv pentru potasiu, se agită atent, evitîndu-se formarea de emulsie și se lasă în repaus 45 de minute.

Se adaugă apoi în fiecare probă 2 ml de apă distilată și probele sînt centrifugate 20—30 de minute, pînă ce soluția devine transparentă.

Partea alicotă se îndepărtează cu ajutorul unei pipete cu bulă și precipitatul se spală cu apă distilată pînă cînd culoarea galbenă a apelor de spălare dispare.

După îndepărtarea prin sifonare a apelor de spălare, la precipitatul din eprubetă se adaugă 2—4 ml soluție de $KMnO_4$ *N*/100 și 1 ml soluție de H_2SO_4 50%. Se agită cu bagheta și eprubetele se introduc într-o baie de apă în clocot timp de 1½ minut. Dacă lichidul se decolorează se adaugă încă 2 ml de $KMnO_4$ soluție *N*/100 și probele se încălzesc din nou 1½ minut.

Eprubetele se așază în stativ și în fiecare se adaugă 3 ml de soluție *N*/100 acid oxalic. Dacă culoarea roză a probelor nu dispare în întregime se mai adaugă 1—2 ml soluție *N*/100 de acid oxalic.

Conținutul eprubetelor se titrează apoi la cald cu o soluție de $KMnO_4$ *N*/100 pînă la apariția culorii roze, care persistă 1 minut.

Calcul. În timpul operațiilor de oxidare și de titrare se utilizează cantități relativ mari (cîțiva ml) și de aceea volumul final de lichid este mare, fapt care necesită un consum mai mare de soluție de $KMnO_4$ *N*/100 pentru colorarea soluției finale în roz pal. Pentru evitarea erorilor în calculul cantității de potasiu se introduce un factor de corecție — 0,02 ml de soluție $KMnO_4$ *N*/100 pentru fiecare ml de soluție finală. Se scade și cantitatea de acid oxalic utilizat (1 ml), iar numărul de ml de soluție $KMnO_4$ *N*/100 se înmulțește cu 7,1, obținîndu-se astfel cantitatea de potasiu în 100 ml ser.

Exemplu de calcul. Fie 1 ml de ser recoltat pentru analiză, 2 ml soluție de $KMnO_4$ *N*/100 luați după centrifugare și 1 ml soluție de H_2SO_4 50%. Soluția încălzită s-a decolorat. Pentru recolorare s-a adăugat 1 ml de soluție de $KMnO_4$ *N*/100. S-a folosit apoi 1 ml de acid oxalic și pentru titrarea finală, 0,42 ml permanganat, care are factorul 0,98 (față de acidul oxalic).

Volumul total=2+1+1+1+0,42=5,42 ml.

Pentru colorare s-au folosit: 5,42×0,02=0,11 ml de soluție $KMnO_4$ *N*/100.

S-au folosit: (3+0,42)×0,98=3,35 ml de $KMnO_4$ soluție exact *N*/100. 3,36—0,11= =3,24 ml de $KMnO_4$ pentru titrarea întregii cantități de potasiu.

Din volumul de $KMnO_4$ utilizat pentru titrarea finală trebuie să se scadă cantitatea de acid oxalic adăugată și care a fost de asemenea titrată tot cu permanganat:

3,24—1=2,24 ml.

Deoarece 1 ml de $KMnO_4$ *N*/100 corespunde la 0,071 mg, concentrația potasiului în 100 ml ser sanguin va fi egală cu:

$$0{,}071 \times 2{,}24 \times 100 = 15{,}9 \text{ mg\%}.$$

Valoarea diagnostică. Cantitatea de potasiu în sîngele pacienților normali variază între 15 și 22 mg%. Valori mai mari se obțin în cazul cînd serul se separă după un timp mai îndelungat de la recoltarea sîngelui. În organismul animal și uman, potasiul are un rol deosebit în activitatea inimii care funcționează în mod normal cînd cantitatea acestuia în sînge este de 13—24 mg%. Creșterea sau micșorarea accentuată a cantității de potasiu în sînge poate avea drept urmare oprirea inimii. Aproximativ tot

potasiul eliminat din organism este pus în evidență în urină. Numai 10—20% din cantitatea totală de potasiu eliminată poate fi găsită în fecale, spre deosebire de sodiu, care este practic absent în fecale și se elimină exclusiv prin urină și transpirație.

Cantitatea de potasiu eliminată prin rinichi crește paralel cu diureza, precum și în acidoze, în stările de inaniție, în traumatisme etc.

Cantități însemnate de potasiu se întîlnesc în organism în cartilaje (230 mg%), în emisferele cerebrale (300 mg%), în mușchi (310 mg%), în inimă și ficat (275—290 mg%), precum și în dinți și nervi (190—225 mg%).

6.2.4. DETERMINAREA CLORULUI URINAR. METODA MOHR

Principiul metodei. Clorurile prezente în urină sînt precipitate sub formă de cloruri de argint în mediu neutru sau slab acid cu o soluție de azotat de argint în prezența cromatului de potasiu ca indicator. După ce întreaga cantitate de clor a fost precipitată sub formă de clorură de argint, prima picătură în exces de azotat de argint reacționează cu cromatul de potasiu formînd cromatul de argint, colorat în roșu-cărămiziu, indicînd sfîrșitul reacției de precipitare a clorurilor.

Reactivi necesari: 1) Azotat de argint soluție (se cîntăresc 29,061 g azotat de argint p.a. și se dizolvă într-un litru de apă distilată. Un ml din această soluție corespunde la 0,01 g de clorură de sodiu); 2) Cromat de potasiu, soluție 10%; 3) Hidroxid de sodiu, soluție *N*/10.

Modul de lucru. Dacă urina conține albumină (v. proba Esbach), aceasta va fi îndepărtată prin filtrare după adăugarea prealabilă a 1 ml de soluție de acid acetic 10%.

Se măsoară exact 10 ml de urină într-un balon cotat de 100 ml, în care se adaugă cu pipeta hidroxid de sodiu pînă la apariția reacției neutre față de hîrtia de turnesol. Conținutul balonului se aduce la semn cu apă distilată. Pentru dozarea clorurilor se iau 5—10 ml de soluție din balonul cotat într-un balon Erlenmeyer de 50 ml și se adaugă cîteva picături (2—3) de cromat de potasiu ca indicator. Conținutul balonului se agită și se titrează cu soluția de azotat de argint pînă la apariția unei colorații roșii-cărămizii ce nu dispare prin agitare.

Calcul. Un ml soluție $AgNO_3$ corespunde după relația stoechiometrică la 0,01 g clorură de sodiu. Dacă N reprezintă numărul de ml de $AgNO_3$, utilizați pentru titrarea a 10 ml de urină diluată, concentrația clorului, exprimată în grame de clorură de sodiu, la 1 litru urină va fi dată de formula:

$$N \times 0{,}01 \times 100 = \text{g NaCl/l urină.}$$

Observații. Sticlăria utilizată pentru determinarea cantitativă a clorului în lichidele biologice trebuie spălată exclusiv cu apă distilată, deoarece apa de robinet conține clor, influențînd negativ asupra rezultatelor analizei.

După titrare se recomandă îndepărtarea imediată a soluției de azotat de argint din biuretă și spălarea sa cu apă distilată. Dacă se produce o ușoară înnegrire a pereților biuretei se recomandă spălarea cu o soluție de iodură de potasiu sau cu acid azotic.

6.2.5. DOZAREA CLORURILOR ÎN SERUL SANGUIN. METODA KEYS

Principiul metodei. Clorurile sînt precipitate sub formă de clorură de argint, folosindu-se o soluție titrată de azotat de argint. Excesul de argint este titrat cu tiocianat de amoniu în prezența alaunului de fier ca indicator:

$$Cl^- + Ag^+ = AgCl$$

$$Ag^+ \text{ (exces)} + SCN^- = AgSCN$$

$$3SCN^- \text{ (exces)} + Fe^{+++} = \underset{\text{roșu}}{Fe(SCN)_3}.$$

Reactivi necesari: 1) Azotat de argint, soluție-stoc. Se dizolvă 23,785 g de $AgNO_3$ într-un litru de apă bidistilată în care clorul este absent (a se verifica !). În momentul utilizării se prepară „soluția de lucru", diluînd 100 ml de soluție-stoc de $AgNO_3$ la 1 l cu apă bidistilată; 2) Sulfocianură de potasiu, soluție-stoc. 19,343 g de KCNS se dizolvă într-un litru de apă bidistilată în care clorul este absent. „Soluția de lucru" se prepară diluînd 100 ml de soluție stoc la 1 l; 3) Acid azotic, p.a., concentrat (fără halogen); 4) Alaun de fier. Se prepară inițial o soluție saturată de sulfat dublu de fier și amoniu, dizolvînd 40 g de reactiv în 100 ml de apă bidistilată. În momentul folosirii reactivului se adaugă HNO_3, picătură cu picătură, pînă la obținerea unei colorații galbene. O tentă roșie a soluției indică prepararea necorespunzătoarea a soluției. Fierul prezent în soluția indicatorului în stare feroasă este transformat în prezența HNO_3 în stare ferică; 5) Soluția standard de NaCl, 0,1 *N*. Se dizolvă exact (!) 5,845 g de NaCl pur într-un litru de apă bidistilată și se utilizează pentru standardizarea celor două soluții-stoc de $AgNO_3$ și KCNS.

Standardizarea reactivilor $AgNO_3$ și KCNS. Cînd reactivii folosiți pentru prepararea soluțiilor sînt corespunzători din punct de vedere analitic, iar cîntărirea s-a efectuat la o balanță analitică foarte sensibilă, soluția-stoc de $AgNO_3$ va fi 0,14 *N* (exact!), iar soluția-stoc de KCNS — 0,20 *N*. Soluțiile de lucru, după diluarea soluțiilor-stoc, vor fi 0,014 *N* și, respectiv, 0,020 N. Deoarece în practica de laborator asemenea condiții ideale se întîlnesc rar este necesară verificarea prealabilă a reactivilor.

Verificarea soluției de $AgNO_3$. Într-un balon Erlenmeyer se pun cu pipeta exact 5 ml de soluție $AgNO_3$ 0,014 *N*, la care se adaugă 10 picături de alaun de fier și 1 ml de HNO_3 concentrat. Titrarea probei se efectuează cu soluția de KCNS, dintr-o microbiuretă de 5 ml, și operația se consideră terminată cînd prima picătură de KCNS în exces colorează soluția în roșu aprins, coloratie care persistă timp de 1 minut. Se titrează 4 probe paralele și în calculul normalității soluției se utilizează media rezultatelor obținute.

Normalitatea soluției de $AgNO_3$ este dată de formula (1):

$$N_{AgNO_3} = \frac{a}{5} \times N_{KCNS} \quad (1)$$

unde:

a este numărul mililitrilor de KCNS utilizați pentru titrare (media a 4 determinări);

5 — numărul de ml de $AgNO_3$, soluție 0,014 N, folosiți;

N_{KCNS} — normalitatea soluției de KCNS 0,02 N.

Verificarea soluției de NaCl și KCNS. Într-un balon Erlenmeyer se iau cu pipeta 0,2 ml de soluție de NaCl, 2 ml de soluție $AgNO_3$ 0,014 N, 0,25 ml de HNO_3 concentrat și 3—4 picături de alaun de fier. Se titrează amestecul dintr-o microbiuretă cu soluție de KCNS 0,02 N, pînă la apariția culorii roșii-cărămizii. Operația de verificare a soluției de NaCl se repetă de 4 ori și pentru calculul normalității soluției se utilizează media celor patru determinări.

Normalitatea soluției de NaCl se calculează după formula (2):

$$N_{NaCl} = \frac{2(N_{AgNO_3}) - (b \times N_{KCNS})}{0{,}20}, \quad (2)$$

unde:

2 este numărul de ml de soluție $AgNO_3$ 0,014 N utilizați pentru determinare;

b — numărul de ml de KCNS folosiți pentru titrarea amestecului (media a patru titrări);

0,20 — ml de NaCl introduși inițial în amestecul care a fost titrat.

Exemplu de calcul. Fie 0,10 N — concentrația soluției standard de NaCl și 0,20 ml — cantitatea de soluție utilizată pentru efectuarea titrării. Pentru cazul (1) s-au folosit 3,42 ml de soluție KCNS 0,02 N, iar în ecuația (2), valoarea b egală cu 0,48 ml de soluție de KCNS, 0,02 N.

$$N_{AgNO_3} = \frac{3{,}42}{5} \times (N_{KCNS}) = 0{,}684 \times (N_{KCNS}) \quad (3)$$

$$N_{NaCl} = \frac{2(N_{AgNO_3}) - 0{,}48\ (N_{KCNS})}{0{,}2}. \quad (4)$$

Substituind în formula (4) valoarea N_{NaCl} cu valoarea reală a soluției 0,1 N și ținînd seama de numărul de mililitri de soluție utilizați (0,2 ml), formula (4) poate fi scrisă astfel (5):

$$0{,}02 = 2(N_{AgNO_3}) - 0{,}48\ (N_{KCNS}). \quad (5)$$

Din formula (3) se cunoaște normalitatea soluției de $AgNO_3$ care este de $0{,}648 \times N_{KCNS}$. Introducînd în formula (3) această valoare se obține:

$$0{,}02 = 2 \times 0{,}684\ (N_{KCNS}) - 0{,}48\ (N_{KCNS}). \quad (6)$$

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Efectuînd operaţiile din formula (6) se poate scrie:

$$0{,}02 = 0{,}888\ (N_{KCNS}), \tag{7}$$

de unde se calculează valoarea N_{KCNS}, care este egală cu:

$$N_{KCNS} = \frac{0{,}02}{0{,}888} = 0{,}0225. \tag{8}$$

Normalitatea soluţiei de $AgNO_3$ poate fi calculată înlocuind în formula (3) valoarea găsită pentru soluţia de KCNS:

$$N_{AgNO_3} = 0{,}684 \times 0{,}0225 = 0{,}0153. \tag{9}$$

Modul de lucru. Se iau cu pipeta 0,2 ml de ser sanguin într-un pahar Hagedorn şi pipeta se spală de 5—6 ori cu apă distilată, iar apele de spălare sînt adăugate la serul din pahar. Se prepară 3 probe paralele. În fiecare probă se măsoară exact (!) 2 ml de soluţie de $AgNO_3$ (diluată! v. reactivii) şi 0,25 ml de acid azotic concentrat.

Probele sînt expuse timp de 30 de minute într-o baie de apă fierbinte (în clocot) şi apoi răcite într-o baie de gheaţă. După răcire se adaugă în fiecare probă 3—4 picături de soluţie de alaun de fier şi se titrează cu soluţia diluată de KCNS (v. reactivii) pînă la obţinerea unei colorăţii roşii-cărămizii, care persistă timp de 1 minut.

Calculul rezultatelor se realizează după formula:

$$\frac{2 \times N_{AgNO_3} - (C \times N_{KCNS})}{d} \times 1\,000, \tag{10}$$

unde:

C este numărul de mililitri soluţie de KCNS utilizaţi pentru titrare (media a trei determinări) şi

d — ml de ser recoltaţi pentru dozarea clorului sanguin. Concentraţia clorului în ser se exprimă în miliechivalenţi (mEg) de clorură la litru de ser sanguin.

Observaţii. Metoda poate fi de asemenea folosită pentru determinarea cantitativă a clorurilor din urină. În acest caz, încălzirea probelor pe baia de apă în clocot este necesară numai atunci cînd urina conţine proteine în cantităţi apreciabile (0,033 g/l), ceea ce indică o stare patologică.

Rezultatele determinărilor se exprimă în grame de NaCl conţinute în 100 ml de urină, calculîndu-se după formula (10), în care coeficientul 1 000 este înlocuit cu indicele 5,85.

6.2.6. DETERMINAREA CLORURILOR ÎN FRUNZELE PLANTELOR

Principiul metodei. Materialul vegetal este tratat cu permanganat de potasiu la cald şi în prezenţa azotatului de argint în exces. O parte din azotatul de argint reacţionează cu clorul eliberat, formînd clo-

rura de argint, iar excesul de $AgNO_3$ este titrat cu rodanat de amoniu în prezența $(NH_4)_2SO_4 \cdot Fe_2(SO_4)_3 \cdot 24H_2O$ ca indicator. Sfîrșitul reacției este indicat de apariția rodanatului de fier de culoare roză.

Reacțiile sînt următoarele:

$$AgNO_3 + NaCl = AgCl + NaNO_3 \quad (1)$$

$$AgNO_3 + NH_4CNS = AgCNS + NH_4NO_3 \quad (2)$$

$$6NH_4CNS + Fe_2(SO_4)_3 = 3Fe(CNS)_3 + 3(NH_4)_2SO_4. \quad (3)$$

Reactivi necesari: 1) Azotat de argint, soluție *N*/100; 2) Acid azotic, soluție diluată (1 parte apă la 1 parte de acid); 3) Permanganat de potasiu, soluție saturată; 4) Glucoză p.a.; 5) Rodanat de amoniu, soluție *N*/100; 6) Soluție indicator $(NH_4)_2SO_4 \cdot Fe(SO_4)_3 \cdot 24H_2O$.

Modul de lucru. Două probe de material vegetal uscat (0,15—0,20 g) se introduc în două baloane Erlenmeyer, cu o capacitate de 100 ml. Se adaugă exact (!) 3 ml soluție $AgNO_3$ *N*/100, 5 ml HNO_3 diluat (1 parte acid și 1 parte apă) și 4—5 picături soluție saturată de permanganat de potasiu. Conținutul baloanelor se încălzește ușor pe o sită de azbest pînă la fierbere (5 minute).

Dacă lichidul din balon se decolorează se adaugă din nou 5 picături permanganat de potasiu și fierberea continuă încă 5 minute. Operația se repetă pînă cînd soluția nu se mai decolorează. În final pentru decolorarea soluției (excesul de permanganat și MnO_2 format colorează soluția) se adaugă glucoză și conținutul baloanelor se încălzește ușor.

În Erlenmeyer se poate observa un precipitat de clorură de argint de culoare albă. După răcirea baloanelor, în ambele probe se adaugă 3—4 picături soluție de indicator. Excesul de azotat de argint este titrat cu soluție de rodanat de amoniu *N*/100 pînă la apariția unei colorații roz pal care persistă 30—45 de secunde.

Calcul. Un ml soluție de azotat de argint *N*/100 (sau rondanat de amoniu) este echivalent cu 0,355 mg clor. Se calculează conținutul clorului pentru 100 g de material vegetal, luîndu-se în considerare cantitatea de material utilizată inițial.

Exemplu de calcul. Fie 2 g de material vegetal recoltat pentru analiză și 1,5 ml soluție de rondanat de amoniu utilizați pentru titrarea probei. Cantitatea de clor în 100 g material vegetal va fi egală cu:

$$\frac{3 - 1{,}5 \times 0{,}355 \times 100}{0{,}2} = 266 \text{ mg}.$$

Observații. În unele cazuri, în timpul fierberii probelor se poate constata apariția unui precipitat de culoare brună, care este condiționat de prezența în mediu de reacție a MnO_2 apărut ca rezultat al reacției (4):

$$3Mn(NO_3)_2 + 2KMnO_4 + 2H_2O = \underset{\text{precipitat brun}}{5MnO_2} + 2KNO_3 + 4HNO_3. \quad (4)$$

Cantitatea de clor în părțile aeriene ale plantelor superioare (tulpină, frunze, ramuri tinere etc.) variază între 186 și 342 mg% (calculat pentru greutate uscată). Astfel, în frunzele de trifoi este de 190 mg%, în lucernă 245 mg% etc. În semințele plantelor de cultură, de asemenea, se găsesc cantități apreciabile de clor. În orz și ovăz, de exemplu, concentrația clorului este de 277 mg% și, respectiv, 342 mg%.

6.2.7. DETERMINAREA FOSFORULUI ANORGANIC. METODA FISKE-SUBBAROW

Fosforul este prezent în țesuturile și lichidele biologice sub diverse forme: fosfați anorganici, fosfor organic solubil în acizi, fosfor lipidic (fosfolipide) și fosfor insolubil în acizi, care intră în compoziția proteinelor (fosfor proteic).

Principiul reacției. Fosforul anorganic, rezultat după mineralizarea eșantioanelor, sub forma ionului ortofosfat, este dozat colorimetric, după reducerea fosfomolibdatului de amoniu, care se formează în prezența unui exces de molibdat de amoniu și în mediu acid.

Reacția de formare a fosfomolibdatului de amoniu este următoarea:

$$H_3PO_4 + 12(NH_4)_2MoO_4 + 21HNO_3 =$$
$$= (NH_4)_3H_4[P(Mo_2O_7)_6] + 21NH_4NO_3 + 10H_2O.$$

Complexul de fosfomolibdat este redus, în mediu slab acid, la „albastru de molibden", care se prezintă sub forma unei soluții coloidale, de culoare albastră. În această soluție sînt prezente molecule de MoO_3 și Mo_2O_5. Atomii cu trepte de valență diferite și cu o puternică acțiune polarizantă conferă soluției o colorație albastră intensă.

În metoda Fiske-Subbarow, ca agent reducător al fosfomolibdatului de amoniu se folosește acidul 1, 2, 4-aminonaftolsulfonic. În comparație cu diverși agenți reducători folosiți în alte metode de dozare a fosforului (acidul ascorbic, sulfatul feros, sulfitul, metabisulfitul, hidrochinona, metolul etc.), acidul 1, 2, 4-aminonaftolsulfonic prezintă numeroase avantaje, sporind specificitatea și sensibilitatea reacției și mărind reproductibilitatea rezultatelor.

Reactivi necesari: 1) Molibdat de amoniu. Se dizolvă 25 g $(NH_4)_2MoO_4$ în 800—850 ml de apă bidistilată și se completează la 1 l[1]; 2) Acid 1, 2, 4, — aminonaftolsulfonic: 15 g de $NaHSO_3$ și 0,5 g Na_2SO_3 se dizolvă în aproximativ 50 ml de apă bidistilată și după aceea se adaugă 0,25 g de acid 1, 2, 4, — aminonaftolsulfonic și volumul soluției se aduce la 100 ml cu apă bidistilată. În momentul utilizării, soluția este diluată în proporție de 1 : 4 cu apă. Reactivul se conservă în

[1] În momentul utilizării molibdatului de amoniu se prepară un amestec, în părți egale, cu reactivul 3.

sticle de culoare brună[1]; 3) Soluție de H_2SO_4 5 *N*. Se amestecă 112,5 ml H_2SO_4 concentrat (atenție!) cu 650 ml de apă bidistilată; 4) Acid tricloracetic, soluție 22%; 5) Clorură de sodiu, soluție 0,85%; 6) $KMnO_4$, soluție 10%; 7) H_2SO_4 concentrat chimic pur; 8) Soluție standard de fosfor: se dizolvă 350,9 mg KH_2PO_4 în 20 ml de soluție H_2SO_4 0,1 *N* și volumul soluției se aduce la 1 l cu apă distilată. Această soluție conține 0,4 mg fosfor în 5 ml de soluție; 9) Apă oxigenată.

a) Determinarea fosforului anorganic în sînge[2]. În două eprubete de centrifugă conice se iau cu pipeta cîte 2 ml de clorură de sodiu, soluție 0,85%, 1 ml de sînge (sau de plasmă sanguină) și 1 ml soluție de acid tricloracetic 22%[3]. Conținutul eprubetelor se agită energic și după 10 minute este centrifugat. Din fiecare probă se recoltează în eprubete curate și uscate 2 ml de filtrat incolor, care corespund după diluare la 0,5 ml sînge total. Concomitent se prepară și o probă martor care constă din 2 ml soluție standard de fosfor și 2 ml soluție de acid tricloracetic 22%. În continuare, probele cu filtrat și proba martor sînt tratate simultan. În eșantioanele cu filtrat se adaugă 2 ml de soluție de molibdat de amoniu (1 parte molibdat+1 parte H_2SO_4, 1 *N*) și 1 ml soluție de acid 1, 2, 4-aminonaftolsulfonic, iar în proba martor se adaugă 5 ml de molibdat de amoniu, 5 ml H_2SO_4, soluție 1 *N*, și 0,5 ml acid 1, 2, 4-aminonaftolsulfonic. Proba martor se aduce la un volum final de 25 ml cu apă bidistilată, iar eșantioanele cu filtrat la 5 ml.

Pregătirea probelor pentru citirea la colorimetrul Duboscq. Toate probele se introduc într-o baie de apă la 37°C, timp de 5 minute, după care se răcesc într-un curent de apă de robinet. Probele sînt citite la colorimetrul Duboscq.

Calculul rezultatelor se realizează după formula:

$$\text{mg\% P} = \frac{0{,}032 \cdot h \cdot 100}{h_1 \times 0{,}5},$$

unde:

h este înălțimea stratului de soluție standard, luată în mod arbitrar;

h_1 — înălțimea stratului de soluție de analizat, citită după colorimetrare;

0,032 — coeficient de calcul; în 25 ml soluție martor, conținutul fosforului anorganic este de $0{,}4 \times 2{,}0 : 5{,}0 = 0{,}16$ mgP. Pentru

[1] Dacă preparatul acidului 1, 2, 4-aminonaftolsulfonic nu este chimic pur și soluțiile lui sînt colorate, se procedează la o purificare prealabilă. În acest scop, într-un litru de apă bidistilată, încălzită la 90°C, se dizolvă 150 g $NaHSO_3$, 10 g Na_2SO_3 și 15 g acid 1, 2, 4-aminonaftolsulfonic. Soluția se filtrează înainte de a se răci. După răcire se adaugă 10 ml HCl concentrat. Precipitatul format este filtrat la vid, spălat cu 300 ml de apă distilată rece, apoi tratat cu alcool etilic pînă în momentul obținerii de soluții alcoolice incolore. Acidul 1, 2, 4-aminonaftolsulfonic astfel obținut este uscat la temperatura camerei și păstrat în borcane brune.

[2] Adaptat după Balahovski, S. D. *Microhimiceskii analiz krovi.* Moskva. Medghiz, 1932, p. 121.

[3] Deoarece eritrocitele conțin cantități însemnate de fosfor organic instabil, pentru dozarea fosforului anorganic în plasmă este necesară centrifugarea imediată a sîngelui după recoltare și separarea plasmei de eritrocite.

colorimetrie s-au utilizat 5 ml soluție standard. La aceeași colorație, conținutul de fosfor în proba analizată va fi de 5 ori mai mic, deci 0,16 : 5 = 0,032 mgP;

0,5 — coeficient de transformare: 2 ml de filtrat corespund la 0,5 ml de sînge total. Deoarece rezultatele se calculează în mg% este necesar să se țină seama de diluție.

Prepararea probelor pentru citirea rezultatelor la fotocolorimetrul Pulfrich. Pentru obținerea curbei etalon se utilizează probe care conțin cantități diferite de fosfor (tabela 32) și sînt citite la fotocolorimetru folosindu-se cuva de 5 cm și la $\lambda = 669$ mμ. Pe abscisă se înscrie extincția *E*, iar pe ordonată, concentrația fosforului, în 5 ml soluție, care corespund la 0,5 ml de sînge total. Pentru calculul rezultatelor în mg% P, concentrația fosforului în proba analizată și obținută prin citirea *E* pe curba etalon se înmulțește cu 100 și se împarte la 0,5.

Tabela 32

Obținerea curbei etalon pentru determinarea cantitativă a fosforului

Reactivi	Proba nr.					
	1	2	3	4	5	6[1]
Soluție standard de fosfor (ml)	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0	0,0
Soluție de molibdat de amoniu în H_2SO_4 (ml)	10	10	10	10	10	10
Soluție de acid 1, 2, 4, aminonaftolsulfonic (ml)	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Apă distilată (ml)	9,0	8,5	8,0	7,5	7,0	10
Probele se introduc într-o baie de apă la 37°C, timp de 5 minute, după care se răcesc într-un curent de apă.						
Concentrația fosforului în 25 ml soluție	0,08	0,12	0,16	0,20	0,24	0,00
Concentrația fosforului în 5 ml, utilizați pentru citirea la fotocolorimetru	0,016	0,024	0,032	0,040	0,048	0,00

[1] Proba martor constă din aceiași reactivi care au fost adăugați în probele etalon, cu excepția soluției standard de fosfor, în locul căreia se adaugă un volum echivalent de apă distilată.

b) Determinarea fosforului total. Într-un microbalon Kjeldahl se introduce 0,05 ml sînge total sau 0,5 ml sînge diluat cu apă distilată în proporția 1 : 10. Se adaugă 2 ml H_2SO_4 soluție 5 *N* și cîteva tuburi capilare pentru asigurarea unei fierberi uniforme. Se acoperă balonul cu o pară de sticlă și conținutul lui se încălzește la flacăra puternică a unui bec de gaz. După o ușoară răcire a conținutului balonului se adaugă direct în soluția din balon (nu pe pereții balonului!) 1—2 picături de apă oxigenată. Balonul este din nou încălzit pînă la completa decolorare a conținutului lui, după care se mai încălzește timp de 10 minute. Dacă conținutul balonului se închide din nou, la culoare se adaugă 2 picături de apă oxigenată și se încălzește din nou pînă la decolorare[1].

După răcirea probelor se adaugă la conținutul baloanelor 2—2,5 ml apă distilată și se trec din baloane într-un cilindru gradat de 25 ml. Baloanele sînt din nou spălate cu apă distilată (1,5—2,0 ml și 1—1,5 ml), iar apele de spălare trecute atent în cilindru. Volumul final al mineralizatului, plus apele de spălare, nu trebuie să depășească 5,5 ml.

Într-un cilindru gradat de 25 ml se introduc 2 ml de soluție standard de fosfor, 5 ml de H_2SO_4, soluție 5 *N* și ulterior, atît în probele cu sînge (mineralizate), cît și în proba etalon, se adaugă următorii reactivi, pe cît posibil, concomitent: molibdat de amoniu și acid 1, 2, 4-aminonaftolsulfonic (cîte 2 ml din fiecare soluție în mineralizate și 5 ml în soluția etalon). Volumul probelor cu mineralizat se aduce la 10 ml cu apă distilată, iar proba de control — la 25 ml.

Probele sînt agitate energic și introduse într-o baie de apă, la 37°C, timp de 5 minute. După răcire sînt citite la colorimetrul Duboscq.

În cazul cînd dozarea fosforului total se realizează prin citirea probelor la fotoelectrocolorimetru se procedează ca și în cazul determinării fosforului anorganic.

c) Determinarea fosforului acidosolubil. Din filtratul preparat în scopul determinării fosforului anorganic se recoltează 0,2—0,5 ml extract tricloracetic și probele se mineralizează după procedura descrisă mai sus pentru fosforul total[2].

---

[1] Cînd apa oxigenată conține fosfor este recomandabil să se folosească pentru mineralizarea probelor acid azotic concentrat.

[2] Calculul rezultatelor în cazul determinări fosforului total și fosforului acidosolubil este similar cu cel descris pentru fosforul anorganic, cu deosebirea că trebuie să se ia în considerare gradul de diluare a probelor.

PREPARAREA SOLUȚIILOR

Greutatea atomică și valența în combinațiile chimice a principalelor elemente chimice

Nr. crt.	Elementul	Nr. de ordine	Simbolul	Valența în principalele combinații chimice	Greutatea atomică
1	2	3	4	5	6
1	Azot	7	N	3;5	14,008
2	Aluminiu	13	Al	3	26,98
3	Argint	47	Ag	1	100,873
4	Arsen	33	As	3;5	74,92
5	Aur	79	Au	1;3	197,0
6	Bariu	56	Ba	2	137,36
7	Beriliu	4	Be	2	9,013
8	Bismut	83	Bi	3;5	208,99
9	Bor	5	B	3	10,82
10	Brom	35	Br	1;3;5;7	79,916
11	Cadmiu	48	Cd	2	112,41
12	Calciu	20	Ca	2	40,08
13	Carbon	6	C	2;4	12,011
14	Clor	17	Cl	1;3;5;7	35,457
15	Cobalt	27	Co	2;3	58,94
16	Crom	24	Cr	2;3:6	52,01
17	Cupru	29	Cu	1;2	63,54
18	Fier	26	Fe	2;3	55,85
19	Fluor	9	F	1	19,00
20	Fosfor	15	P	3;5	30,975
21	Hidrogen	1	H	1	1,0080
22	Iod	53	I	1;3;5;7	126,91
23	Litiu	3	Li	1	6,940
24	Magneziu	12	Mg	2	24,32
25	Mangan	25	Mn	2;3;4;6;7	54,94
26	Mercur	80	Hg	1;2	200,61
27	Molibden	42	Mo	3;4;6	95,95
28	Nichel	28	Ni	2;3	58,71
29	Oxigen	8	O	2	16,000
30	Plumb	82	Pb	2;4	207,21
31	Potasiu	19	K	1	39,100
32	Siliciu	14	Si	4	28,09
33	Sodiu	11	Na	1	22,991
34	Staniu	50	Sn	2;4	118,70
35	Stronțiu	38	Sr	2	87,63
36	Sulf	16	S	2;4;6	32,066
37	Telur	52	Te	2;4;6	127,61
38	Uraniu	92	U	4;6	238,07
39	Vanadiu	23	V	3;5	50,95
40	Wolfram	74	W	6	183,86
41	Zinc	30	Zn	2	65,38

BCU Cluj / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Indicatori frecvent folosiți în practica de laborator

Nr. crt.	Indicatorul	Sinonimie și denumiri comerciale	Solventul în care se prepară indicatorul[1]	Punct de viraj (pH)	Coloraţia în mediu	
					acid	bazic
1	2	3	4	5	6	7
1	Albastru de bromfenol	Tetrabromfenolsulfonaftaleină (Na)	Et OH[2]	3,0—3,6	galben	albastru-violet
2	Albastru de timol (viraj în mediu acid)	Timolsulfonftaleină	Et OH[1]	1,2—2,8	roşu	galben
3	Albastru de timol (viraj în mediu alcalin)	Timolsulfonftaleină	Et OH 20%	8,0—9,6	galben	albastru
4	Alizarină	Dihidroxiantrachinonă. Indicator Schaal	H_2O	10,1—12,1	galben	liliachiu
5	Fenolftaleină	Dihidroxinaftalfenonă; 2,2-bis (p-hidroxifenilftaleidă) Indicator Luck	Et OH 70%	8,3—10	incolor	roşu
6	Hematoxilină			5—6		
7	Metiloranj	Tropeolin D; Oranj III Heliantină, Indicator Lunge	H_2O	2,9—4,0	roşu	galben
8	α-naftolftaleină	—	Et OH 90%	9,0—11,0	galben	albastru
9	Nitramina	Picrilmetilnitramină	Et OH 70%	11,0 – 13,0	incolor	roşu-cărămiziu
10	o-nitrofenol	—	Et OH 50%	2,4—4,0	incolor	galben
11	p-nitrofenol	—	H_2O	5,0—7,0	incolor	galben
12	Purpur de m-crezol (viraj în mediu acid)		2,6 ml 0,1 *N* NaOH	1,2—2,8	galben	purpur
13	Purpur de m-crezol		2,6 ml 0,1 *N* NaOH	7,4—9,0	galben	purpur
14	Purpur de bromcrezol	Dibrom-o-crezolsulfonaftaleină (Na)	Et OH 20%	5,2—6,8	galben	violet

[1] În mod obişnuit se prepară soluţii 0,1% de indicatori.
[2] Et OH — alcool etilic.

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Continuare

1	2	3	4	5	6	7
15	Roşu de clor fenol	Diclorfenolsulfonaftaleină (Na)	2,36 ml 0,1 *N* NaOH	4,8—6,4	galben	violet-roşu
16	Roşu de brom-fenol		Et OH 20%	5,2—6,8	galben	purpur
17	Roşu de Congo	Tetrazodifenil naftionat de sodiu	90 ml H_2O + +10ml EtOH	3 —5,2	violet	roz-oranj
18	Roşu de crezol (în mediu alcalin)	o-crezolsulfonaftaleină (Na)	Et OH 20%	7,2—8,8	galben	roşu
19	Roşu de crezol (în mediu acid)	„	2,62 ml 0,1 *N* NaOH	0,2—1,8	roşu	galben
20	Roşu de fenol	Fenolsulfonaftaleină	Et OH 20%	6,8—8,4	galben	roşu
21	Roşu de metil	Methil rot, Sarea de Na a acidului dimetilamino-azobenzen-2-carbonic	Et OH 90%	4,4—6,0	roşu	galben
22	Roşu neutru		Et OH 70%	6,8—8,0	roşu	brun-oranj
23	Timoftaleină		Et OH 90%	9,3—10,5	incolor	albastru
24	Timol albastru	Timol blau Timosulfontaleină (Na)	2,15 ml 0,1*N* NaOH	8,0—9,6	galben	albastru
25	Tropeolin O	Acid resorcin azobenzensulfonic	H_2O	11,1—12,7	galben	roşu-cărămiziu
26	Tropeolin OO	Acid difenilaminoazo-p-benzensulfonic; oranj IV	H_2O	1,4—2,6	roşu	galben
27	Tropeolin OOO	Acid α-naftolazobenzen-p-sulfonic	H_2O	7,6—8,9	galben	roz-roşu
28	Verde de brom-crezol	Tetrabrom-m-crezol-sulfonftaleină (Na)	1,4 ml soluţie 0,1 *N* NaOH[3]	3,8—5,4	galben	albastru

[3] Volumul soluţiei finale se aduce la 250 ml cu apă distilată.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Prepararea soluțiilor normale și molare ale reactivilor frecvent folosiți în laborator

Nr crt.	Denumirea reactivului	Formula	Greutatea moleculară	Pentru prepararea soluțiilor		Cantitatea exprimată în g/l sau ml/l[1] de reactiv necesar
				N	*M*	
1	2	3	4	5	6	7
1	Acid acetic	CH_3COOH	60,05	3	—	172 ml (99—100%)
2	Acid clorhidric	HCl	36,47	3	—	258 ml (36%)
3	Acid azotic	HNO_3	63,02	3	—	195 ml (69%)
4	Acid fosforic	H_3PO_4	98,00	9	—	205 ml (85%)
5	Acid sulfuric	H_2SO_4	98,08	6	—	168 ml (95%)
6	Acetat de plumb	$(CH_3COOH)_2Pb \cdot 3H_2O$	379,35	1	0,5	190 g
7	Acetat de sodiu	CH_3COONa	82,04	3	3	408 g
8	Azotat de aluminiu	$Al(NO_3)_3 \cdot 7,5\ H_2O$		0,5	0,167	58 g
9	Azotat de amoniu	NH_4HO_3	80,05	1	1	80 g
10	Azotat de argint	$AgNO_3$	169,89	0,5	0,5	85 g
11	Azotat de bariu	$Ba(NO_3)_2$	261,38	0,5	0,25	65 g
12	Azotat de bismut	$Bi(NO_3)_35H_2O$	485,10	0,25	0,083	40 g[2]
13	Azotat de calciu	$Ca(NO_3)_2$	164,10	0,5	0,25	41 g
14	Azotat de cobalt	$Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$	291,05	0,5	0,25	73 g
15	Azotat de magneziu	$Mg(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$	256,43	0,5	0,25	64 g
16	Azotat de plumb	$Pb(NO_3)_2$	331,23	0,5	0,25	83 g
17	Azotat de potasiu	KNO_3	101,10	0,5	0,5	51 g
18	Azotat de sodiu	$NaNO_3$	85,01	0,5	0,5	43 g
19	Azotat de zinc	$Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$	297,49	0,5	0,25	74 g
20	Bicromat de potasiu	$K_2Cr_2O_7$	294,21	—	0,125	37 g
21	Carbonat de potasiu	K_2CO_3	138,20	3	1,4	207 g
22	Carbonat de sodiu	Na_2CO_3	106,00	3	1,5	159 g
23	Carbonat de sodiu	$Na_2CO_3 \cdot 10H_2O$	286,16	3	1,5	430 g
24	Clorură de aluminiu	$AlCl_3$	133,34	0,5	0,167	22 g
25	Clorură de amoniu	NH_4Cl	53,50	3	3	160 g

[1] Pentru acizii minerali și organici se indică în paranteză concentrația pentru care s-au calculat volumele necesare pentru prepararea soluțiilor normale.

[2] Se dizolvă în soluție de HNO_3 (1 parte acid + 5 părți apă distilată).

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Continuare

1	2	3	4	5	6	7
26	Clorură de bariu	$BaCl_2 \cdot 2H_2O$	244,31	0,5	0,25	61 g
27	Clorură de calciu	$CaCl_2 \cdot 6H_2O$	219,09	0,5	0,25	55 g
28	Clorură de cupru	$CuCl_2 \cdot 2H_2O$	170,49	0,5	0,25	43 g
29	Clorură ferică	$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	270,32	1,5	0,5	135,2 g[1]
30	Clorură de potasiu	KCl	74,55	0,5	0,5	37 g
31	Clorură de sodiu	NaCl	58,45	0,5	0,5	29 g
32	Fericianură de potasiu	$K_3[Fe(CN)_6]$	329,25	0,5	0,167	55 g
33	Fericianură de potasiu	$K_4[Fe(CN)_6]$	422,39	2	0,5	211 g
34	Hidroxid de bariu	$Ba(OH)_2 \cdot 8H_2O$	315,51	0,4	0,2	63 g
35	Hidroxid de calciu	$Ca(OH)_2$	74,10	0,04	0,02	1,5 g
36	Hidroxid de potasiu	KOH	56,10	3	3	176 g
37	Hidroxid de sodiu	NaOH	40,01	3	3	126 g
38	Iodură de potasiu	KI	166,02	0,5	0,5	83 g
39	Oxalat de amoniu	$(NH_4)_2C_2O_4$	142,12	0,5	0,25	35,5 g
40	Sulfat de aluminiu	$Al_2(SO_4)_3 \cdot 18H_2O$	666,45	0,5	0,083	56 g
41	Sulfat de amoniu	$(NH_4)_2SO_4$	132,15	0,5	0,25	33 g
42	Sulfat de cadmiu	$CdSO_4 \cdot 4H_2O$	280,54	0,5	0,25	70 g
43	Sulfat de cupru	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	249,69	1	0,5	124,8 g[2]
44	Sulfat de magneziu	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	246,50	0,5	0,25	62 g
45	Sulfat de potasiu	K_2SO_4	174,26	0,5	0,25	44 g
46	Sulfat de sodiu	Na_2SO_4	142,06	0,5	0,25	36 g
47	Sulfat de zinc	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	287,56	0,5	0,25	72 g

[1] Se dizolvă inițial în 500 ml apă distilată, la care se adaugă 20 ml HCl concentrat. După dizolvarea completă se aduce la 1 l cu apă distilată.

[2] Se dizolvă inițial 124,8 g $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ în 500 ml apă distilată, la care se adaugă 20 ml HCl concentrat. Se aduce la semn după dizolvarea completă cu apă distilată.

BCU CLUJ / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Prepararea soluțiilor tampon

1. Soluție tampon de Na_2HPO_4 și acid citric (după Mc Ilvaine)

*p*H=2,2—8,0

Nr. crt.	*p*H	Soluție de Na_2HPO_4 0,2 *M* (ml)	Soluție de acid citric 0,1 *M* (ml)
1	2,2	0,40	19,60
2	2,4	1,24	18,76
3	2,6	2,18	17,82
4	2,8	3,17	16,83
5	3,0	4,11	15,89
6	3,2	4,94	15,06
7	3,4	5,70	14,30
8	3,6	6,44	13,56
9	3,8	7,10	13,90
10	4,0	7,71	12,29
11	4,2	8,28	11,72
12	4,4	8,82	11,18
13	4,6	9,35	10,65
14	4,8	9,86	10,14
15	5,0	10,30	9,70
16	5,2	10,72	9,28
17	5,4	11,15	8,85
18	5,6	11,60	8,40
19	5,8	12,09	7,91
20	6,0	12,63	7,37
21	6,2	13,22	6,78
22	6,4	13,85	6,15
23	6,6	14,55	5,45
24	6,8	15,45	4,55
25	7,0	16,47	3,53
26	7,2	17,39	2,61
27	7,4	18,17	1,83
28	7,6	18,73	1,27
29	7,8	19,15	0,85
30	8,0	19,45	0,55

Observație. Pentru prepararea soluției de Na_2HPO_4 0,2 *M* se vor dizolva 35,61 g de preparat în 1 000 ml apă bidistilată. Soluția de acid citric 0,1 *M* se prepară prin dizolvarea a 21,01 g de acid citric chimic pur într-un l de apă bidistilată.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

2. Soluție tampon de acid citric — citrat de sodiu
(după N. Hemington și R. M. C. Dawson)
$pH = 3,0 — 6,2$

Nr. crt.	pH	Soluție de acid citric 0,1 *M* (ml)	Soluție de citrat de sodiu 0,1 *M* (ml)
1	3,0	16,4	3,6
2	3,2	15,5	4,5
3	3,4	14,6	5,4
4	3,6	13,7	6,3
5	3,8	12,7	7,3
6	4,0	11,8	8,2
7	4,2	10,8	9,2
8	4,4	9,9	10,1
9	4,6	8,9	11,1
10	4,8	8,0	12,0
11	5,0	7,0	13,0
12	5,2	6,1	13,9
13	5,4	5,1	14,9
14	5,6	4,2	15,8
15	5,8	3,2	16,8
16	6,0	2,3	17,7
17	6,2	1,6	18,4

Observație. Pentru prepararea soluției de acid citric 0,1 *M* se dizolvă 21,01 g de acid citric într-un l de apă distilată, iar pentru soluția de citrat de sodiu se dizolvă 29,4 g citrat într-un litru de apă distilată.

3. Soluție tampon de acetat de sodiu — acid acetic (după Walpone)
$pH = 3,6 — 5,8$

Nr crt.	pH la 18°C	Soluție de acetat de sodiu 0,2 *M* (ml)	Soluție de acid acetic 0,2*M* (ml)
1	3,6	0,75	9,25
2	3,8	1,20	8,80
3	4,0	1,80	8,20
4	4,2	2,65	7,35
5	4,4	3,70	6,30
6	4,6	4,90	5,10
7	4,8	5,90	4,10
8	5,0	7,00	3,00
9	5,2	7,90	2,10
10	5,4	8,60	1,40
11	5,6	9,10	0,90
12	5,8	9,40	0,60

BCU IASI CENTRALA UNIVERSITARA LIBRARY

4. Soluție tampon de acid boric — borax (după Holmes)
*p*H=7,4—9,0

Nr. crt.	*p*H	Soluție de borax 0,05 *M*	Soluție de acid boric 0,2 *N*
1	7,4	1,0	9,0
2	7,6	1,5	8,5
3	7,8	2,0	8,0
4	8,0	3,0	7,0
5	8,2	3,5	6,5
6	8,4	4,5	5,5
7	8,7	6,0	4,0
8	9,0	8,0	2,0

Prepararea soluțiilor. Soluția de borat 0,05 *M* conține 19,07 g de borat în 1 000 ml apă distilată. Pentru prepararea soluției de acid boric 0,2 *M* se dizolvă 12,37 g de acid boric într-un l de apă distilată.

5. Soluție tampon de Na_2HPO_4 — NaH_2PO_4 (după Sörensen)
*p*H=5,8—8,0

Nr. crt.	*p*H	Soluție de Na_2HPO_4 0,2 *M* (ml)	Soluție de KaH_2PO_4 0,2 *M* (ml)	Observații
1	5,8	8,0	92,0	Volumul final al amestecului celor două soluții molare se aduce la 200 ml cu apă distilată
2	6,0	12,3	87,7	
3	6,2	18,5	81,5	
4	6,4	26,5	73,5	
5	6,6	37,5	62,5	
6	6,8	49,0	51,0	
7	7,0	61,0	39,0	
8	7,2	72,0	28,0	
9	7,4	81,0	19,0	
10	7,6	87,0	13,0	
11	7,8	91,5	8,5	
12	8,0	94,7	5,3	

Observații. Pentru prepararea soluției de Na_2HPO_4 0,2 *M* se pot folosi preparatele de $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ (greutate moleculară 178,05) și $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ (greutate moleculară 358,22). Pentru prepararea unei soluții de fosfat 0,2 *M* din primul preparat se vor folosi 35,61 g/1 000 ml, din al doilea preparat, 71,64 g/1 000 ml apă distilată.

În cazul utilizării $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ (greutate moleculară 138,0) se vor folosi 27,6 g care se vor dizolva într-un l de H_2O distilată sau $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ (greutate moleculară 156,03) — 31,21 g se vor dizolva în 1 000 ml de apă distilată.

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

6. Soluție tampon glicină — hidroxid de sodiu
(*p*H=8,55—10,90)

Nr. crt.	*p*H	Soluție de glicină 0,1 *M* (ml)	Soluție de NaOH 0,1 *N* (ml)	Nr. crt.	*p*H	Soluție de glicină 0,1 *M* (ml)	Soluție de NaOH 0,1 *N* (ml)
1	8,55	94,78	5,22	25	9,75	67,5	32,5
2	8,60	94,20	5,80	26	9,80	66,2	33,8
3	8,65	93,59	6,41	27	9,85	64,8	35,2
4	8,70	92,90	7,10	28	9,90	63,8	36,2
5	8,75	92,29	7,81	29	9,95	62,7	37,3
6	8,80	91,40	8,60	30	10,00	61,7	38,3
7	8,85	90,52	9,48	31	10,05	60,7	39,3
8	8,90	89,60	10,40	32	10,10	59,8	40,2
9	8,95	88,60	11,40	33	10,15	59,0	41,0
10	9,00	87,60	12,4	34	10,20	58,1	41,9
11	9,05	86,60	13,4	35	10,25	57,3	42,7
12	9,10	85,40	14,6	36	10,30	56,5	43,5
13	9,15	84,20	15,8	37	10,35	55,9	44,1
14	9,20	83,00	17,0	38	10,40	55,2	44,8
15	9,25	81,80	18,2	39	10,45	54,7	45,3
16	9,30	80,30	19,7	40	10,50	54,2	45,8
17	9,35	79,20	20,8	41	10,55	53,8	46,2
18	9,40	77,70	22,3	42	10,60	53,3	46,7
19	9,45	76,30	23,7	43	10,65	53,0	47,0
20	9,50	74,80	25,2	44	10,70	52,6	47,4
21	9,55	73,5	26,5	45	10,75	52,3	47,7
22	9,60	72,0	28,0	46	10,80	52,0	48,0
23	9,65	70,5	29,5	47	10,85	51,8	48,2
24	9,70	69,0	31,0	48	10,90	51,5	48,5

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

7. Soluție tampon glicină — acid clorhidric (după Sörensen)

*p*H=1,1—3,3; 10,95—12,90

Nr. crt.	*p*H	Soluție de glicină 0,1 *M* (ml)	Soluție de HCl 0,1 *N* (ml)	Nr. crt.	*p*H	Soluție de glicină 0,1 *M* (ml)	Soluție de HCl 0,1 *N* (ml)
1	1,10	5,70	94,3	44	3,25	89,0	11,0
2	1,15	10,2	89,8	45	3,30	89,2	10,8
3	1,20	14,6	85,4	49	10,95	51,3	48,7
4	1,25	18,6	81,4	50	11,00	51,1	48,9
5	1,30	22,6	77,4	51	11,05	50,9	49,1
6	1,35	25,8	74,2	52	11,10	50,7	49,3
7	1,40	28,9	71,1	53	11,15	50,4	49,6
8	1,45	31,6	68,4	54	11,20	50,2	49,8
9	1,50	33,8	66,2	55	11,25	50,0	50,0
10	1,55	25,8	64,2	56	11,30	49,8	50,2
11	1,60	38,0	62,0	57	11,35	49,6	50,4
12	1,65	39,8	60,2	58	11,40	49,4	50,6
13	1,70	41,7	58,3	59	11,45	49,2	50,8
14	1,75	43,5	56,5	60	11,50	49,0	51,0
15	1,80	45,3	54,7	61	11,55	48,8	51,2
16	1,85	46,2	53,8	62	11,60	48,6	51,4
17	1,90	48,7	51,3	63	11,65	48,4	51,6
18	1,95	50,4	49,6	64	11,70	48,1	51,9
19	2,00	51,9	48,1	65	11,75	47,5	52,5
20	2,05	53,4	46,6	66	11,80	47,4	52,6
21	2,10	54,9	45,1	67	11,85	47,0	53,0
22	2,15	56,2	43,8	68	11,90	46,6	53,4
23	2,20	57,6	42,4	69	11,95	46,1	53,9
24	2,25	59,0	41,0	70	12,00	45,6	54,4
25	2,30	60,3	39,7	71	12,05	44,9	55,1
26	2,35	62,0	38,0	72	12,10	44,2	55,8
27	2,40	63,6	36,4	73	12,15	43,4	56,6
28	2,45	65,4	34,6	74	12,20	42,6	57,4
29	2,50	66,6	33,4	75	12,25	41,6	58,4
30	2,55	68,4	31,6	76	12,30	40,6	59,4
31	2,60	69,6	30,4	77	12,35	39,4	60,6
32	2,65	71,1	28,9	78	12,40	38,2	61,8
33	2,70	72,8	27,2	79	12,45	36,4	63,6
34	2,75	74,4	25,6	80	12,50	34,6	65,4
35	2,80	76,0	24,0	81	12,55	32,3	67,7
36	2,85	77,6	22,4	82	12,60	30,0	70,0
37	2,90	79,2	20,8	83	12,65	27,5	72,5
38	2,95	80,7	19,3	84	12,70	25,0	75,0
39	3,00	82,1	17,9	85	12,75	22,0	78,0
40	3,05	83,5	16,5	86	12,80	19,0	81,0
41	3,10	84,8	15,2	87	12,85	15,1	84,9
42	3,15	86,0	14,0	88	12,90	10,0	90,0
43	3,20	88,0	12,0				

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Greutatea specifică a soluțiilor apoase de NaOH la 20°C

Greutatea specifică	% NaOH	Grame de NaOH în 100 ml	Greutatea specifică	% NaOH	Grame de NaOH în 100 ml
1,000	0,16	0,16	1,155	14,2	16,38
1,005	0,60	0,61	1,160	14,6	16,98
1,010	1,05	1,06	1,165	15,1	17,58
1,015	1,49	1,51	1,170	15,5	18,18
1,020	1,94	1,98	1,175	16,0	18,79
1,025	2,39	2,44	1,180	16,4	19,40
1,030	2,84	2,92	1,185	16,9	20,02
1,035	3,30	3,40	1,190	17,4	20,64
1,040	3,75	3,88	1,195	17,8	21,27
1,045	4,20	4,39	1,200	18,3	21,90
1,050	4,67	4,89	1,205	18,7	22,54
1,055	5,11	5,39	1,210	19,2	23,18
1,060	5,55	5,90	1,215	19,6	23,83
1,065	6,01	6,41	1,220	20,1	24,49
1,070	6,48	6,92	1,225	20,5	25,14
1,075	6,92	7,45	1,230	21,0	25,80
1,080	7,38	7,97	1,235	21,4	26,48
1,085	7,82	8,49	1,240	21,9	27,15
1,090	8,28	9,03	1,245	22,4	27,83
1,095	8,74	9,56	1,250	22,8	28,52
1,100	9,19	10,11	1,255	23,3	29,51
1,105	9,65	10,66	1,260	23,7	29,90
1,110	10,1	11,21	1,265	24,2	30,60
1,115	10,6	11,77	1,270	24,7	31,30
1,120	11,0	12,33	1,275	25,1	32,00
1,125	11,5	12,90	1,280	25,6	32,71
1,130	11,9	13,70	1,290	26,5	34,16
1,135	12,4	14,04	1,295	26,9	34,89
1,140	12,8	14,62	1,300	27,4	35,62
1,145	13,3	15,20	1,305	27,9	86,37
1,150	13,7	15,79	1,310	28,3	37,11
1,315	28,8	37,86	1,420	39,0	55,36
1,320	29,3	38,62	1,425	39,5	56,28
1,325	29,7	39,39	1,430	40,0	57,20
1,330	30,2	40,16	1,435	40,5	58,12
1,335	30,7	40,92	1,440	41,0	59,08
1,340	31,1	41,72	1,445	41,6	60,04
1,345	31,6	42,52	1,450	42,1	61,00
1,350	32,1	43,32	1,455	42,6	61,96
1,355	32,6	44,12	1,460	43,1	62,96
1,360	33,1	44,96	1,465	43,6	63,92
1,365	33,5	45,80	1,470	44,2	64,92
1,370	34,0	46,60	1,475	44,7	65,92
1,375	34,5	47,44	1,480	45,2	66,92
1,380	35,0	48,32	1,485	45,8	67,92
1,385	35,5	49,16	1,490	46,3	68,92
1,390	36,0	50,04	1,495	46,8	69,96
1,395	36,5	50,92	1,500	47,3	71,00
1,400	37,0	51,80	1,505	47,9	72,00
1,405	37,5	52,68	1,510	48,4	73,04
1,410	38,0	53,56	1,515	48,9	74,08
1,415	38,5	54,44	1,520	49,4	75,12

BCU CLUJ CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Greutatea specifică a soluțiilor apoase de KOH la 20°C

Greutatea specifică	% KOH	Grame KOH în 100 ml	Greutatea specifică	% KOH	Grama KOH în 100 ml
1,000	0,20	0,20	1,155	16,8	19,38
1,005	0,74	0,75	1,160	17,3	20,06
1,010	1,30	1,31	1,165	17,8	20,75
1,015	1,84	1,87	1,170	18,3	21,43
1,020	2,38	2,43	1,175	18,8	22,14
1,025	2,93	3,00	1,180	19,4	22,83
1,030	3,47	3,58	1,185	19,9	23,53
1,040	4,03	4,17	1,190	20,4	24,24
1,045	4,58	4,76	1,200	21,4	25,66
1,050	5,12	5,35	1,205	21,9	26,37
1,055	5,66	5,94	1,210	22,4	26,08
1,060	6,20	6,54	1,215	22,9	26,80
1,065	6,74	7,14	1,220	23,4	28,52
1,070	7,28	7,75	1,225	23,9	29,24
1,075	7,82	8,37	1,230	24,4	29,98
1,080	8,36	8,99	1,235	24,9	30,70
1,085	8,89	9,60	1,240	25,4	31,40
1,090	9,43	10,23	1,245	25,9	32,18
1,095	9,96	10,86	1,250	26,3	32,93
1,100	10,5	11,49	1,255	26,8	33,67
1,105	11,6	12,13	1,260	27,3	34,42
1,110	12,1	12,77	1,265	27,8	35,17
1,115	12,6	13,41	1,270	28,3	35,93
1,120	13,1	14,06	1,275	28,8	36,68
1,125	13,7	14,72	1,280	29,3	37,44
1,130	14,2	15,37	1,285	29,7	38,20
1,135	14,7	16,04	1,290	30,2	38,98
1,140	15,2	16,69	1,295	30,7	39,73
1,145	15,7	17,35	1,300	31,2	40,50
1,150	16,3	18,02	1,305	31,6	41,26
1,310	32,1	42,04	1,420	42,2	59,86
1,315	32,6	42,82	1,425	42,6	60,71
1,320	33,0	43,60	1,430	43,0	61,55
1,325	33,5	44,39	1,435	43,5	62,39
1,330	34,0	45,18	1,440	43,9	63,25
1,335	34,4	45,96	1,445	44,4	64,10
1,340	34,9	46,77	1,450	44,8	64,95
1,345	35,4	47,56	1,455	45,2	65,81
1,350	35,8	48,36	1,460	45,7	66,66
1,355	36,3	49,16	1,465	46,1	67,53
1,360	36,7	49,96	1,470	46,5	68,40
1,365	37,2	50,76	1,475	47,0	69,27
1,370	37,7	51,58	1,480	47,4	70,14
1,375	38,2	52,40	1,485	47,8	71,01
1,380	38,6	53,21	1,490	48,3	71,89
1,385	39,0	54,03	1,495	48,7	72,77
1,390	39,5	54,85	1,500	49,1	73,65
1,395	39,9	55,69	1,505	49,5	74,54
1,400	40,4	56,52	1,510	50,0	75,43
1,405	40,8	57,35	1,515	50,4	76,33
1,410	41,3	58,18	1,520	50,8	77,22
1,415	41,7	59,02	1,525	51,2	78,11

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Greutatea specifică a soluțiilor de acid fosforic preparate în apă (20°/4°C)

Greutatea specifică	% (exprimate în greutate) de acid acetic	Grame la *l* de soluție	Greutatea specifică	% (exprimate în greutate) de acid acetic	Grame la *l* de soluție
0,9982	0	. . .	1,0488	40	419,5
0,9996	1	9,996	1,0498	41	430,4
1,0012	2	20,02	1,0507	42	441,3
1,0025	3	30,08	1,0516	43	452,2
1,0040	4	40,16	1,0525	44	463,1
1,0055	5	50,28	1,0534	45	474,0
1,0069	6	60,41	1,0542	46	484,9
1,0083	7	70,58	1,0551	47	495,9
1,0097	8	80,78	1,0559	48	506,8
1,0111	9	91,00	1,0567	49	517,8
1,0125	10	101,3	1,0575	50	528,8
1,0139	11	111,5	1,0582	51	539,7
1,0154	12	121,8	1,0590	52	550,7
1,0168	13	132,2	1,0597	53	561,6
1,0182	14	142,5	1,0604	54	572,6
1,0195	15	152,9	1,0611	55	583,6
1,0209	16	163,3	1,0618	56	594,6
1,0223	17	173,8	1,0624	57	605,6
1,0236	18	184,2	1,0631	58	616,6
1,0250	19	194,8	1,0637	59	627,6
1,0263	20	205,3	1,0642	60	638,5
1,0276	21	215,8	1,0648	61	649,5
1,0288	22	226,3	1,0653	62	660,5
1,0301	23	236,9	1,0658	63	671,5
1,0313	24	247,5	1,0662	64	682,4
1,0326	25	258,2	1,0666	65	693,3
1,0338	26	268,8	1,0671	66	704,3
1,0349	27	279,4	1,0675	67	715,2
1,0361	28	290,1	1,0678	68	726,1
1,0372	29	300,8	1,0682	69	737,1
1,0384	30	311,5	1,0685	70	748,0
1,0395	31	322,2	1,0687	71	758,8
1,0406	32	333,0	1,0690	72	769,7
1,0417	33	343,8	1,0693	73	780,6
1,0428	34	354,6	1,0694	74	791,4
1,0438	35	365,3	1,0696	75	803,2
1,0449	36	376,2	1,0698	76	813,0
1,0459	37	387,0	1,0699	77	823,8
1,0469	38	397,8	1,0700	78	834,6
1,0479	39	408,7			

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Greutatea specifică a soluțiilor de hidroxid de amoniu preparate în apă (la 15°C)

Greutatea specifică	% de NH_3 (exprimată în greutate)	Grame de NH_3 la 1 de soluție	Greutatea specifică	% de NH_3 (exprimată în greutate)	Grame de NH_3 la 1 de soluție
1,000	0,00	0,0	0,940	15,63	136,9
0,998	0,45	4,5	0,938	16,22	152,1
0,996	0,91	9,1	0,936	16,82	157,4
0,994	1,37	13,6	0,934	17,42	162,7
0,992	1,84	18,2	0,932	18,03	168,1
0,990	2,31	22,9	0,930	18,64	173,4
0,988	2,80	27,7	0,928	19,25	178,6
0,986	3,30	32,5	0,926	19,87	184,2
0,984	3,80	37,4	0,924	20,49	189,3
0,982	4,30	42,2	0,922	21,12	194,7
0,980	4,80	47,0	0,920	21,75	200,1
0,978	5,30	51,8	0,918	22,39	205,6
0,976	5,80	56,6	0,916	23,03	210,9
0,974	6,30	61,4	0,914	23,68	216,3
0,972	6,80	66,1	0,912	24,33	221,9
0,970	7,31	70,9	0,910	24,99	227,4
0,968	7,82	75,7	0,908	25,65	232,9
0,966	8,33	80,5	0,906	26,31	238,3
0,964	8,84	85,2	0,904	26,98	243,9
0,962	9,35	89,9	0,902	27,65	249,4
0,960	9,91	95,1	0,900	28,33	255,0
0,958	10,47	100,3	0,898	29,01	260,5
0,956	11,03	105,4	0,896	29,69	266,0
0,954	11,60	110,7	0,894	30,37	271,5
0,952	12,70	115,9	0,892	31,05	277,0
0,950	12,72	121,0	0,890	31,75	282,6
0,948	13,31	126,2	0,888	32,50	288,6
0,946	13,88	131,3	0,886	33,25	294,6
0,944	14,46	136,5	0,884	34,10	301,4
0,942	15,04	141,7	0,882	34,95	308,3

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Greutatea specifică a soluțiilor de acid citric preparate în apă (la 15°C)

Greutatea specifică	% de $C_6H_8O_7 + H_2O$	Grame la 1 l de soluție
1,0074	2	20,15
1,0149	4	40,60
1,0227	6	61,36
1,0309	8	82,47
1,0392	10	103,9
1,0470	12	125,6
1,0549	14	147,7
1,0632	16	170,1
1,0718	18	192,9
1,0805	20	216,1
1,0889	22	239,6
1,0972	24	263,3
1,1060	26	287,6
1,1152	28	312,3
1,1244	30	337,3
1,1333	32	362,7
1,1422	34	388,3
1,1515	36	414,5
1,1612	38	441,3
1,1709	40	468,4
1,1814	42	496,2
1,1899	44	523,6
1,1998	46	551,9
1,2103	48	580,9
1,2204	50	610,2
1,2307	52	640,0
1,2410	54	670,1
1,2514	56	700,8
1,2627	58	732,4
1,2738	60	764,3
1,2849	62	796,6
1,2960	64	829,4
1,3071	66	862,7

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Greutatea specifică a soluțiilor de acid clorhidric preparate în apă (la 20°/4°C)

Greutatea specifică	% de HCl	Grame de HCl la 1 l de soluție
1,0032	1	10,03
1,0082	2	20,16
1,0181	4	40,72
1,0279	6	61,67
1,0376	8	83,01
1,0474	10	104,7
1,0574	12	126,9
1,0675	14	149,5
1,0776	16	172,4
1,0878	18	195,8
1,0980	20	219,0
1,1083	22	243,8
1,1187	24	261,5
1,1290	26	293,5
1,1392	28	319,0
1,1493	30	344,8
1,1593	32	371,0
1,1691	34	397,5
1,1789	36	424,4
1,1885	38	451,6
1,1980	40	479,2

Greutatea specifică a soluțiilor de acid oxalic preparate în apă (la 17,5°C)

Greutatea specifică	Procente de $H_2C_2O_4+2H_2O$	Grame la 1 l de soluție
1,0035	1	10,04
1,0070	2	20,14
1,0105	3	30,32
1,0140	4	40,56
1,0175	5	50,88
1,0210	6	61,26
1,0245	7	71,72
1,0280	8	82,24
1,0315	9	92,84
1,0350	10	103,5
1,0385	11	114,2
1,0420	12	125,0
1,0455	13	135,9

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Greutatea specifică a soluțiilor de tartrat de potasiu preparate în apă (la 20°/4°C)

Greutatea specifică	% de $K_2C_4H_4O_6$	Grame la 1 l de soluție
1,0048	1	10,05
2,0114	2	20,23
1,0248	4	40,99
1,0383	6	62,30
1,0519	8	84,15
1,0657	10	106,6
1,0798	12	129,6
1,0941	14	153,2
1,1087	16	177,4
1,1236	18	202,3
1,1387	20	227,7
1,1540	22	253,9
1,1697	24	280,7
1,1855	26	308,2
1,2017	28	336,5
1,2181	30	365,4
1,2606	35	441,2
1,3051	40	522,0
1,3516	45	608,2
1,4001	50	700,1

Greutatea specifică a soluțiilor de acid percloric preparate în apă (la 15°/4°C)

Greutatea specifică	Procent de $HClO_4$	Grame la 1 l de soluție
1,005	1	10,05
1,011	2	20,22
1,023	4	40,91
1,035	6	62,09
1,047	8	83,77
1,060	10	106,0
1,073	12	128,7
1,086	14	152,0
1,100	16	175,9
1,114	18	200,4
1,128	20	225,6
1,143	22	251,4
1,158	24	277,9
1,174	26	305,2
1,190	28	333,2
1,207	30	362,0
1,224	32	391,6
1,242	34	422,2
1,260	36	453,7

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

(Continuare)

Greutatea specifică	Procent de $HClO_4$	Grame la 1 l soluție
1,279	38	486,2
1,299	40	519,6
1,352	45	608,4
1,410	50	705,2
1,473	55	810,3
1,539	60	923,3
1,606	65	1 044,0
1,674	70	1 172,0

Greutatea specifică a soluțiilor de acid fosforic preparate în apă (20°/40°C)

Greutatea specifică	% de H_3PO_4	Grame de H_3PO_4 la 1 l soluție
1,0038	1	10,04
1,0092	2	20,18
1,0200	4	40,80
1,0309	6	61,85
1,0420	8	83,36
1,0532	10	105,3
1,0647	12	127,8
1,0764	14	150,7
1,0884	16	174,1
1,1008	18	198,1
1,1134	20	222,7
1,1263	22	247,8
1,1395	24	273,5
1,1529	26	299,8
1,1665	28	326,6
1,1805	30	354,2
1,216	35	425,6
1,254	40	501,6
1,293	45	581,9
1,335	50	667,5
1,379	55	758,5
1,426	60	855,6
1,475	65	958,8
1,526	70	1 068
1,579	75	1 184
1,633	80	1 306
1,689	85	1 436
1,746	90	1 571
1,770	92	1 628
1,794	94	1 686
1,819	96	1 746
1,844	98	1 807
1,870	100	1 870

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Greutatea specifică a soluțiilor de hidroxid de potasiu preparate în apă (la 15°/4°C)

Greutatea specifică	% de KOH	Grame la 1l de soluție	Greutatea specifică	% de KOH	Grame la 1 l de soluție
1,0083	1	10,08	1,2592	27	340,0
1,0175	2	20,35	1,2695	28	355,5
1,0267	3	30,80	1,2800	29	371,2
1,0359	4	41,44	1,2905	30	387,2
1,0452	5	52,26	1,3010	31	403,3
1,0544	6	63,26	1,3117	32	419,7
1,0637	7	74,46	1,3224	33	436,4
1,0730	8	85,84	1,3331	34	453,5
1,0824	9	97,42	1,3440	35	470,4
1,0918	10	109,2	1,3549	36	487,8
1,1013	11	121,1	1,3659	37	505,4
1,1128	12	133,3	1,3769	38	523,2
1,1203	13	145,6	1,3879	39	541,3
1,1299	14	158,2	1,3991	40	559,6
1,1396	15	170,9	1,4203	41	578,2
1,1493	16	183,9	1,4215	42	597,0
1,1590	17	197,0	1,4329	43	616,1
1,1688	18	210,4	1,4443	44	635,5
1,1786	19	223,9	1,4558	45	655,1
1,1884	20	237,7	1,4673	46	675,0
1,1984	21	251,7	1,4790	47	695,1
1,2083	22	265,8	1,4907	48	715,5
1,2184	23	280,2	1,5025	49	736,2
1,2285	24	294,8	1,5143	50	757,2
1,2387	25	309,7	1,5262	51	778,4
1,2489	26	324,7	1,5382	52	799,9

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Greutatea specifică a soluțiilor de H_2SO_4 preparate în apă (la temperatura de 20°/4°C)

Greutatea specifică	% de H_2SO_4 (în greutate)	Grame de H_2SO_4 la 1 l de soluție
1,0095	1	10,10
1,0207	2	20,41
1,0318	3	30,95
1,0428	4	41,71
1,0538	5	52,69
1,0648	6	63,89
1,0758	7	75,31
1,0869	8	86,95
1,0979	9	98,81
1,1089	10	110,9
1,1309	12	138,7
1,1530	14	161,4
1,1751	16	188,0
1,1972	18	215,5
1,2191	20	243,8
1,2411	22	273,0
1,2629	24	303,1
1,2848	26	334,0
1,3064	28	365,8
1,3279	30	398,4
1,3490	32	431,7
1,3696	34	465,7
1,3900	36	500,4
1,4101	38	535,8
1,4300	40	572,0
1,4494	42	608,7
1,4685	44	646,1
1,4873	46	684,2
1,5065	48	723,1
1,5253	50	762,7
1,0051	1	10,05
1,0118	2	20,24
1,0184	3	30,55
1,0250	4	41,00
1,0317	5	55,59
1,0385	6	62,31
1,0453	7	75,17
1,0522	8	84,18
1,0591	9	95,32
1,0661	10	106,6
1,0731	11	118,0
1,0802	12	129,6
1,0874	13	141,4
1,0947	14	153,3
1,1020	15	165,3
1,1094	16	177,5
1,1168	17	189,9
1,1243	18	202,4

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

(Continuare)

Greutatea specifică	% de H_2SO_4 (în greutate)	Grame de H_2SO_4 la 1 l de soluție
1,1318	19	215,0
1,1394	20	227,9
1,1471	21	240,9
1,1548	22	154,1
1,1626	23	269,4
1,1704	24	288,9
1,1783	25	294,6
1,1862	26	308,4
1,1942	27	322,4
1,2023	28	336,6
1,2104	29	351,0
1,2185	30	365,6
1,2267	31	380,3
1,2349	32	395,2
1,2432	33	410,3
1,2515	34	425,5
1,2599	35	441,0
1,2684	36	456,6
1,2769	37	472,5
1,2855	38	488,5
1,2941	39	504,7
1,3028	40	521,1
1,3116	41	537,8
1,3205	42	554,6
1,3294	43	571,7
1,3384	44	588,9
1,3476	45	606,4
1,3569	46	624,2
1,3663	47	642,2
1,3758	48	660,4
1,3854	49	678,8
1,3951	50	697,6
1,4049	51	716,5
1,4148	52	735,7
1,4248	53	755,1
1.4350	54	774,9
1,4453	55	794,9
1,4557	56	815,2
1,4662	57	835,7
1,4768	58	856,5
1,4875	59	877,6
1,4983	60	899,0
1,5091	61	920,6
1,5200	62	942,4
1,5310	63	964,5
1,5421	64	936,9
1,5533	65	1010
1,5646	66	1033
1,5760	67	1056
1,5874	68	1079
1,5989	69	1103

BCU Cluj / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

(Continuare)

Greutatea specifică	% de H_2SO_4 (în greutate)	Grame de H_2SO_4 în 1 l de soluție
1,6505	70	1127
1,6221	71	1152
1,6338	72	1177
1,6456	73	1201
1,6574	74	1226
1,6692	75	1252
1,6810	76	1278
1,6927	77	1303
1,7043	78	1329
1,7158	79	1355
1,7272	80	1382
1,7383	81	1408
1,7491	82	1434
1,7594	83	1460
1,7693	84	1486
1,7786	85	1512
1,7872	86	1537
1,7951	87	5062
1,8022	88	5086
1,8087	89	1610
1,8184	90	1633
1,8195	91	1656
1,8240	92	1678
1,8279	93	1700
1,8312	94	1721
1,8337	95	1742
1,8355	96	1762
1,8364	97	1781
1,8361	98	1899
1,8342	99	1816
1,8305	100	1881

Greutatea specifică a soluțiilor de $Na_2CO_3.10H_2O$ preparate în apă (temperatura de 20°/4°C)

Greutatea specifică	% de $Na_2CO_3.10H_2O$	Grame la 1 l soluție
1,0086	2,70	27,23
1,0190	5,40	55,02
1,0398	10,80	112,3
1,0606	16,20	171,8
1,0816	25,60	239,6
1,1029	27,00	297,7
1,1244	32,40	364,3
1,1463	37,80	433,3

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Greutatea specifică a soluțiilor de acid azotic preparate în apă (la temperatura de 20°/4°C)

Greutatea specifică	% de HNO_3	Grame la 1l de soluție	Greutatea specifică	% da HNO_3	Grame la 1l de soluție
1,0036	1	10,04	1,3160	51	671,2
1,0091	2	20,18	1,3219	52	687,4
1,0146	3	30,44	1,3278	53	703,7
1,0201	4	40,80	1,3336	54	720,1
1,0256	5	51,28	1,3393	55	736,6
1,0312	6	61,87	1,3449	56	793,1
1,0369	7	72,58	1,3505	57	769,8
1,0427	8	83,42	1,3560	58	786,5
1,0485	9	94,37	1,3614	59	803,2
1,0543	10	105,4	1,3667	60	820,0
1,0602	11	116,6	1,3719	61	836,9
1,0661	12	127,9	1,3769	62	853,7
1,0721	13	139,4	1,3818	63	870,5
1,0781	14	150,9	1,3836	64	887,4
1,0842	15	162,6	1,3913	65	904,3
1,0903	16	174,4	1,3959	66	921,3
1,0964	17	186,4	1,4004	67	938,3
1,1026	18	198,5	1,4048	68	955,3
1,1088	19	210,7	1,4091	69	972,3
1,1150	20	223,0	1,4134	70	989,4
2,1213	21	235,5	1,4176	71	1006
1,1276	22	248,1	1,4218	72	1024
1,1340	23	260,8	1,4258	73	1041
1,1404	24	273,7	1,4298	74	1058
1,1469	25	286,7	1,4337	75	1075
1,1534	26	299,9	1,4375	76	1093
1,1650	27	353,2	1,4413	77	1110
1,1666	28	326,6	1,4450	78	1127
1,1733	29	340,3	1,4486	79	1144
1,1800	30	354,0	1,4521	80	1162
1,1867	31	367,9	1,4555	81	1179
1,1934	32	381,9	1,4589	82	1196
1,2502	33	396,1	1,4622	83	1214
1,2071	34	410,4	1,4655	84	1231
1,2140	35	424,9	1,4686	85	1248
1,2205	36	439,4	1,4716	86	1266
1,2270	37	454,0	1,4745	87	1283
1,2335	38	468,7	1,4773	88	1300
1,2399	39	483,6	1,4800	89	1317
1,2465	40	698,5	1,4826	90	1334
1,2527	41	513,6	1,4850	91	1351
1,2590	42	528,8	1,4873	92	1368
1,2655	43	544,2	1,4892	93	1385
1,2719	44	559,6	1,4912	94	1402
1,2783	45	575,2	1,4932	95	1419
1,2847	46	591,0	1,4952	96	1435
1,2911	47	606,8	1,4974	97	1452
1,2975	48	622,8	1,5008	98	1471
1,3040	49	639,0	1,5056	99	1491
1,3100	50	655,0	1,5129	100	1513

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Punctul de fierbere al unor solvenți organici

Denumirea solventului	Punctul de fierbere °C
Alcool etilic	78,5
Alcool metilic	64,6
Alcool butilic (n)	117,70
Alcool n-amilic	138,0
Eter etilic	34,6
Eter de petrol	60—80
Acetonă	56,5
Cloroform	61,26
Toluen	110,63
Benzen	80,10
Piridină	115,3
Acid acetic	118,1
Anhidridă acetică	140,0

Logaritmii pentru calcularea valorii *p*H-ului

	0	0,5	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4	4,5	5	6	7	8	9
1	000	021	041	061	079	097	114	130	146	161	176	204	230	255	279
2	301	312	322	332	342	352	362	371	380	389	398	415	431	447	462
3	477	484	491	498	505	512	519	525	531	538	544	556	568	580	591
4	602	607	613	618	623	628	633	638	643	648	65	663	672	681	690
5	699	703	708	712	716	720	724	728	732	736	740	748	756	763	771
6	778	782	785	789	792	796	799	803	806	810	813	820	826	833	839
7	845	848	851	854	854	860	863	866	869	872	875	881	886	892	898
8	903	906	903	911	914	916	919	922	924	927	929	935	940	944	949
9	954	957	959	961	964	966	968	971	973	975	978	982	987	991	996

BIBLIOGRAFIE

Aarsen, P. N. şi Kemp, A. *Rapid spectrophotometric micromethod for determination of histaminaze activity.* Nature (London) (1964), *204*, p. 1195.

Ahunbaeva, B. O. şi Ishakova, N. A. *Fructozanî zerna pşeniţî.* Biohimia (1961), *26*, 1, p. 57—60.

Asatiani, V. S. *Biohimiceskaia fotometria.* Moskva, Izd. Akademii Nauk S.S.S.R. (1957).

Asatiani, V. C. *Metodî biohimiceskih issledovanii.* Moskva, Gosizdat. În „Mediţînskoi literaturî". Medghiz (1956).

Aglica Edreva. *Vierhu metoda na kjeldahl za opredelenie na azot.* Izd. Instituta rastenievodstva Bolgarskoi Akademii Nauk (1963), kniga *16*, p. 159—164.

Baar, S. A. *A simple colorimetric method for the estimation of chlorides in serum.* Clin. chim. acta (1962), *7*, nr. 5, p. 642—46.

Bernardi, G. *Chromatography of nucleic acids on hydroxypatite.* Nature (London) (1965), *206*, p. 779—783.

Benedict, S. R. *The determination of uric acid in blood.* J. Biol. chem. (1922), *51*, p. 187—207.

Bach, A. N. *Zur Kenntnis der Katalase.* Ber. dtsch. chem. Ges. (1905), *38*, p. 1878.

Bach, A. N. şi Zubkova, C. R. *Contribution à l'étude des indices d'enzimes du sang. Dosage de la catalase, de la peroxydase et de l'éthérase dans une goutte de sang.* C. R. Acad. Sci. Paris (1920), *171*, p. 967—1001.

Bach, A. N. şi Ivaniţki-Vasilenko, E. C. *Über die Fermentzahlen des Blutes.* II. *Schwankungen der Katalase- und Proteasenzahlen während 24 Stunden bei Tieren und Menschen.* Biochem. Z. (1924), *148*, p. 460—4651.

Baldwin, E. *Dynamic aspects of biochemistry.* London, 1948.

Belozerskii, A. N. şi Proscureakov, N. I. *Prakticeskoe rukovodstvo po biohimii rastenii.* Moskva, Sovetskaia nauka, (1951).

Blok, R. şi Bolling, D. *Aminokislotnîi sostav belkov i pişcevîh produktov.* Moskva, Izd. Inostrannoi literaturî (1949).

Benedict, S. R. şi Newton, E. B. *The use of tungstomolibdic acid as a precipitant for blood proteins.* J. Biol. Chem. (1929), *83*, p. 357—360.

Benedict, S. R. *The Analysis of whole blood. I. The precipitation of the proteins.* J. Biol Chem. (1931), *92*, p. 135—139.

Bergmann, F. şi Dikstein, Sh. *New Methods for Purification and Separation of Purines.* În: „Methods of Biochemical Analysis", Edited by David Glick, vol. VI, Interscience Publishers, Inc., New York, Interscience Publ. LTD. London (1961), p. 79—94.

Bernfeld, P. şi Gürtler, P. *Recherches sur l'amidon. XXXVIII. Méthode perfectionnée de dégradation β-amylolitique de l'amylose et de l'amylopectine.* Helv. Chim. Acta (1948), *31*, p. 106—108.

Bertrand, G. şi Thomas, P. *Guide pour les manipulations de chimie biologique.* Paris, M. Dunod et E. Pinat (1910).

BCU CLUJ / BABEŞ-BOLYAI UNIVERSITY LIBRARY

Bertrand, D. *Remarques à propos du microdosaje des sucres réducteurs.* Bul-Soc. Chim. Biol. (1953), *35*, p. 865—867.

Bial, M. Deut. Med. Wochschr, *28*, 253 (1902) citat după Chem. Zentr. (1902), II, p. 295. — Deut. Med. Wochsch., *29*, 477 (1903) citat după Chem. Zentr. (1903), II, p. 1021.

Block, R. T. şi Bolling, D. *The amino acid composition of proteins and foods. Analytical Methodes and results.* New York, Second Printing (1947).

Bogoiavlenskaia, N. V. şi Tongur, V. C. *Izucenie mehanisma sinteza poliribonukleotidov fermentnoi sistemî jîvotnîh tkanei.* Biohimia (1962), *27*, 4, p. 670—678.

Borsook, H. şi Dubnoff, J. W. *Methods for the determination of submicro-quantities of total nitrogen, amonia, aminonitrogen, amides, peptides, adenylic acid and nitrates.* J. Biol. Chem. (1939), *131*, p. 163—176.

Braunstein, A. E. *Ucenie o fermentah na sovremennom etape.* V „*Osnovî molekulearnoi biologhii. Fermentî*". Moskva, Izd. „Nauka" (1964), p. 7—20.

Bresler, S. E. *Vvedenie v molekulearnuiu biologhiu.* Moskva—Leningrad, Izd. Akademii Nauk S.S.S.R. (1963).

Braun, R. G. şi Diurnbaum, V. I. *Sravnitelnîe dannîe o nukleotidnom sostave ribonukleinovoi kislotî mozgovoi tkani.* Vestn. Leningradskovo Universiteta (1961), nr. 9, p. 100—106.

Bull, G. B. *Fiziceskaia biohimia.* Moskva, Izd. Inostrannoi literaturî (1949).

Bulaţki, N. P. şi Leviţki, A. P. *Ekstrakţionno-bikromatnîi mikrometod opredelenia aktivnosti lipazî.* Vopr. med. Himii (1964), *4*, p. 426—428.

Cair, F. H. şi Price, A. A. *Colour reactions attributed to vitamin A.* Biochem. J. (1926), *20*, p. 497—501

Cohn, E. J. şi Hendry, J.L. *Organic Synthesis.* Coll., vol. II, (1943), p. 120.

Comar, C. L. şi Bronner, F. *Mineral Metabolism. An advanced treatise, vol. II. The Elements, part. B.* Academic Press New York and London (1962).

Conway, E. J. — LXII. *An absorption apparatus for the microdetermination of certain volatile substances.* II. The determination of urea and ammoniac in body fluids. Biochem. J. (1933), *27*, p. 430—434.

Conway, E. J. — CCCXXIX. *Apparatus for the microdetermination of certain volatile substances.* IV. The blood ammonia, with observation on normal human blood. Biochem. J. (1935), *29*, p. 2755—2772.

Conway, E. J. şi Byrne, A. — LXI. *An absorption apparatus for the microdetermination of certain volatile substances. I. The microdetermination of ammonia.* Biochem. J. (1933), *27*, p. 419—429.

Gretova, G. G. şi Şapot, V. S. *Vîdelnie kislotonerastvorimîh polinukleotid-peptidov iz jîvotnîh kletki.* Biohimia (1965), *30*, 3, p. 634—643.

Datta, S. P.; Overell, G. G.; Stack-Dunne, M. *Chromatography on Aluminia-impregnated Filter-Paper.* Nature (London) (1949), *164*, p. 673.

De Waard, D. J. *Eine Mikrobestimmung des Calciums in Blut. Serum und anderen organischen Substanzen.* Biochem. Zeitsch (1919), *97*, p. 176—185.

De Waard, D. J. *Mikrocalciumbestimmung direkt im Serum.* Biochem. Zeitsch. (1919) *97*, p. 186—188.

Dixon, M. şi Webb, E. *Fermentî.* Moskva, Izd. Inostrannoi literaturî (1961).

Dische, Z. *Color Reaction of Pentoses.* În: „*Methods in Carbohydrate Chemestry*" edited by R. L. Whisteler and M. L. Wolfram, Academic Press, New York, London (1962)

Dulamanis, A.; Coghlan, T. P.; Wirtour, M.; Hudson, B. *The estimation of testosterone in biological fluids.* II. *Testosterone in urine.* Austral. J. Exptl. Biol. and Med. Sci, (1964), *42*, p. 385,—400.

Dumitru, I. F. *Biochimia creierului.* II. *Studii asupra cantităţii şi vitezei de refacere a lipidelor totale din creier.* În: „Studii şi cercet. biochimie" (1962), *4*, (5), p. 561—571.

Dumitru, I. F. *Izucenie skorosti obnovlenia holesterina i obşcei frakţii lipidov peceni v norme i pri gormonalnih vozdeistviah (kortizon-aţetat i insulin).* Teză, Leningrad, (1958).

Dumitru, I. F. *Soderjanie i intensivnosti obmena otdelnih fosfolipidnih frakţii v golovnom mozgu.* Dizertaţie, Leningrad, 1962.

Dumitru, I. F. şi Verbeek, R. *Interaction entre l'effet de la coumarine et de la gibberelline sur la formation de l'α-amylase dans l'orge.* Arch. Intern. de Physiol. Biochim. (1964), *74*, p. 9.

Engelgardt, V. A. şi Smirnova, L. *Uprosceonnii metod opredelenia holesterina v krovi i sîvorotke.* J. experim. biol. i med. (1928), 7, p. 16—21.

Evreinova, T. N.; Ermolaeva, L. P.: Gherasimova, A. M. *Purinovîe i pirimidinovîe osnovania termofilnovo varianta Bacillus Mycoides.* D.A.N. S.S.S.R. (1958), *118*, p. 334—337.

Fehling, H. Ann. (1849), *72*, p. 106, citat după Feigl (1960).

Feigl, F. R. *Spot testo in organic analysis.* Elsevier Publishing Company. Amsterdam, London, New York, Princeton, (1960).

Ferdman, D. L. *Biohimia.* Vîsşaia Şkola, Moskva (1959).

Fischer, Ed. H. şi Haselbach, Gh. *Contribution à l'étude de l'α-amylase de malt. Sur les enzymes amylolytiques.* Helv. Chim. Acta (1951), *34*, p. 325—334.

Fiske, C. şi Subbarow, Y. *The colorimetric determination of phosphorus.* J. Biol. Chem. (1925), *66*, p. 375—400.

Fishman, W. H. şi Davidson, H. M. *Determination of serum acid phosphatases.* În *„Methods of Biochemical Analysis"* vol. IV. Edyted by D. Glick, Interscience Publishers. Inc., New York, Interscience London (1961), p. 257—284.

Fizer, L. şi Fizer, M. *Organiceskaia himia.* Moskva, Izd. Inostrannoi literaturî (1949).

Folin, O. *Unlaked blood as a basis for blood analysis.* J. Biol. Chem. (1930), *86*, p. 173—178.

Folin, O. şi Wu, H. *A system of Blood Analysis.* J. Biol. Chem. (1919), *38*, p. 98—100.

Fomin, A. A.; Fedorov, N. A.; Kasatkin, I. N. *Kolicestvennoe opredelenie jirnîh kislot s pomoşciu raspredelitelnoi hromatografii.* Vopr. med. himii, (1963), *1*, p. 76—79.

Foulger, J. H. *The use of the Molisch (α-Naphtol) reactions in the study of sugars in biological fluids.* J. Biol. Chem. (1931), *92*, p. 345—353.

Friedemann, T. E. şi Kendall, A. I. *The determination of lactic acid.* J. Biol. Chem. (1929), *82*, p. 23—43.

Friedemann, T. E.; Cotonio, M.; Shaffer, P. A. *The determination of lactic acid.* J. Biol. Chem. (1927), *73*, p. 335—358.

Fujita, A. şi Iwatake, D. *Bestimmung des echten Blutzuckers ohne Hefe.* Biochem. Zeitschr. (1931), *242*, p. 43—60.

Georghiev, G. P. şi Montieva, V. L. *Videlenie kletocinîh iader fenolnîm metodom i ih harakteristika.* Biohimia, (1960), *25*, *1*, p. 143—150.

Goetze, E. (redactor principal). *Fiziopatologie.* Bucureşti, Editura medicală (1963).

Gonţea, I. *Controlul alimentelor.* Bucureşti (1956).

Graham, R. C. Jr. şi Lundholm, U. *Cytochemical demonstration of peroxidase activity 3-amino-9-ethyl carbozole.* J. Histochem. and. Cytochem. (1965), *13*, *2*, p. 150—152.

Hagedorn, H. C. şi Jensen, B. N. *Zur Microbestimmung des Blutzuckers mittels Ferricyanid.* Biochem. Zeitschr. (1923), *135*, p. 46—58.

Hais, I. M. şi Macek, K. *Cromatografia pe hîrtie.* Bucureşti, Editura tehnică (1960).

Häkkinen, H. M. şi Kulonen, E. *An artefact in the chromatographic analysis of 2,4-dinitro-phenylhydrazones of keto acids.* J. Chromatogr. (1965), *18*, 1, p. 174—176.

Halliwell, G. *„Cellulose" in „Methoden der Enzymatischen Analyse" herausgegeben von Hans-Ulbrich Bergmeyer.* Verlag Chemie GMBH Weinheim/Bergst (1962), *64,* p. 74—78.

Hammersten, O. *Textbook of Physiological Chemistry.* New York, T. Wiley Sons, (1900).

Harnach, F. şi Coolidge, T. B. *Determination of Ionized Calcium in Serum with Murexide.* Anal. Biochem. (1963), *6,* p. 477—85.

Harris, G. *The Enzyme Content and Enzymic Transformation of Malt.* În: „Barley and Malt Biology, Biochemistry, Technology", Edited Cy A. H., Cook. Academic Press, New York and London (1962), p. 583—694.

Harris, I. *Structure and catalytic activity of alcool dehydrogenases.* Nature (1964), *203,* p. 30—34.

Härtel, A. *Schnellmetode zur Bestimmung von Vitamin A in Futtermitteln.* Z. analyt. Chem. (1965), *208,* 2, p. 117—126.

Heinrich, B. J.; Grimes, M. D.; Puckett, J. E. *Sulfur.* În: „Treatise on analytical chemistry". Part. II. Analytical chemistry of the elements, vol. 7. Edited by I. M. Kolthoff. P. J. Elving, E.B. Sandell. Interscience Publishers, New York — London, (1961), p. 59.

Hennemann, P. H.; Rourke, M.; Jackson, W. P. U. *Depression of serum alkaline phosphatase activity by human serum albumin.* J. Biol. Chem. (1955), *213,* p. 19—25.

Hiller, A.; Greif, R. L.; Beckmann, W. W. *Determination of protein in urine by the biuret method.* J. Biol. Chem. (1948), *176,* p. 1421—1429.

Hiller, A.; Plazin, T.; Van Slyke, D. D. *A study of conditions for kjeldahl. Determination of nitrogen in proteins. Description of methods with mercury as catalyst, an titrimetric and gasometric measurements of the ammonia formed.* J. Biol. Chem. (1948), *176,* p. 1401—1420.

Hodge, J. E. *The Amadori Rearrangement.* În: „Advances in Carbohydrate Chemistry", vol. 10, (1955).

Hodgman, Ch. D.; Weact, R. C.; Shankland, R. S. *Handbook of chemistry and Physics. A. Readyreference book of chemical and physical data. Forty-fourth edition.* Published by The Chemical Rubber. Publishing Co, Cleveland, Ohio (U.S.A.), (1963).

Hofmann, Ed.; Eünsch, A.; Galler, I. *Aktivität der Saccharase und Wachstumsintensität bei Pflanzen.* Naturwissenschaft (1963), *50,* p. 133.

Hooghwinkel, G. J. M.; Borri, P.; Riemersa, J. C. *Separation of homologus cerebroside by silica gel column and thin layer chromatography.* Récueil trav. chim. (1964), *83,* 6, p. 576—580.

Howe, P. E. *The use of Sodium Sulphate as the Globulin Precipitant in the Determination of Protein in Blood.* J. Biol. Chem. (1921), *49,* p. 93—107.

Huggins, Ch. şi Talalay, P. *Sodium phenolphtalein phosphate as a substrate for Phosphatase tests.* J. Biol. Chem. (1945), *159,* p. 399—410.

Hurst, R. O.; Little, J. A.; Butler, G. C. *The Enzymatic Degradation of Thymonucleic Acid. II. The Hydrolysis of Oligonucleotids.* J. Biol. Chem. (1951), *188,* p. 705—715.

James, W. O. *Plant respiration.* Oxford at the Clarendon Press (1953).

James, W. O. *Demonstration and Separation of Noradrenaline, Andrenaline and Methyladrenaline.* Nature (1948), *161,* p. 851.

Javillier, M.; Polonovski, M.; Florkin, M.; Boulanger, P.; Lemoigne, M.; Roche, J.; Wurmser, R. *Traité de Biochimie Générale. Tom. I. Composition chimique des organismes.* Premier fascicule. Paris, Masson et Co. Editeurs, (1959).

Judd, R.; Elinor, H.; Kwok Gregory. *A rapid ultramicro tehnique for alkaline phosphatase.* Amer. J. Med. Technol (1964), *30,* 2, p. 87—93.

Iurkievicz, A. M.; Severin, E. S.; Braunstein, A. E. *Organiceskie kofactorî fermentov-kofermentî.* În: „Osnovî molekulearnoi biologhii-fermentî", Moskva, Izd. „Nauka" (1961), p. 147—191.

BCU IASI

Kallinikova, M. N. *Titrimetrische Bestimmung des Magnesiums im Serum.* Biochem. Zeitschr. (1930), *220*, p. 278—282.

Kassab, R. *Les polyphénoloxydases.* Bull. Soc. pharmac. Marseille, (1961), *10*, nr. 39, p. 231—61.

Klopştok, A. S. şi Kovarskii, I. A. *Rukovodstvo po kliniceskim, himiceskim, mikroskopiceskim i bakteriologhiceskim isslodovaniam.* Moskva, Gosizdat (1929).

Kodicek, E. şi Reddi, K. K. *Paper Chromatography of Nicotinic Acid Derivates.* Nature (1951), *168*, p. 475—476.

Kocetkov, N. K. şi Budovskii, E. I. *Himiceskaia modificaţiia nukleinovîh kislot.* În: „Molekulearnaia biologhia. Problemî i perspectivî" p. 139—146. Moskva, Izd. „Nauka" (1964).

Keys, A. *The microdetermination of chlorides in Bilogical Materials.* J. Biol. chem. (1937), *119*, p. 389—403.

Kîbardin, C. A. *Hromatografia biopolimerov na fosfatkalţievîh gheleah.* În: „Uspehi himii (1965), *34* (8), p. 1172—1487.

Kirby, K. S. *A New Method for the Isolation of Deoxyribonuleic Acids. Evidence an the Nature of linkage between Deoxyribonuleic Acid and Protein.* Biochem. J. (1957), *66*, p. 495—504.

Korostelev, P. P. *Prigotovlenie rastvorov dlea himiko-analiticeskih rabot.* Moskva, Izd. Akademii Nauk S.S.S.R., (1962).

Kramer, B. şi Tisdall, F. F. *A Simple Technique for the Determination of Calcium and Magnesium in small Amounts of Serum.* J. Biol. Chem (1921), *47*, p. 475—481.

Kramer, B. şi Tisdall, F. *A Clinical Method for the Quantitative Determination of Potassium in Small Amounts of serum.* J. Biol. Chem. (1941), *46*, p. 339—349.

Krebs, H. A. şi Hornberg, H. L. *Energy transformation in living matter (a survey).* Springer-Verlag, Berlin, Göttingen Heidelberg (1957).

Kritskii, G. A. *O promejutocinom nukleotidnom obmene v kostnom mozgu v norme i posle rentghenovskovo oblucenia.* Biohimia (1959), *24*, 1, p. 73—79.

Kum-Tatt, Lu şi Leong, P. C. *A new method for the determination of ascorbic acid in urine.* Clin. chem. (1964), *10*, p. 575—580.

Kunitz, M. *Crystalline ribonuclease.* J. Gen. Physiol (1940), *24*, 1, p. 15—32.

Kunitz, M. *Isolation of crystalline desoxyribonulease from beef pancreas.* Science (1948), *108*, p. 19—20.

Küntzel, A. şi Dröscher, Th. *Über die bei der Biuretreaktion entstehenden farbigen Kupferkomplexe mit Eiweißkörpern und Eiweißabbauprodukten.* Biochem. Zeitschr. (1940), *306*, p. 177—204.

Lamb, G. A.; Bentley, O. G.; Beattie, J. M. (editors). *Trace elements.* Academic Press Inc. New York and London (1958).

Laufer, L. şi Stewart, E. Chem. Abstr. (1951), *45*, p. 8037.

Lee Rodkey, F. *Tris-(hydroxymethil)-aminomethane as a standard for Kjeldahl nitrogen analysis.* Clin. Chem. (1964), *10*, p. 606—610.

Lento, H. G.; Ford, J. A.; Denton, A. E. *A method for determining 5'-nucleotides.* J. Food Sci. (1964), *29*, 4, p. 435—442.

Lipetz, J. *Peroxidase interference with cytochrome oxidaze localisation in plant cells.* J. Histochem. and Cytochem. (1965), *13*, p. 300—301.

Liteanu, C. *Manual de chimie analitică cantitativă. Volumetrie.* Bucureşti, Editura tehnică (1956).

Little, J. A. şi Butler, G. C. *1. The Enzymatic degradation of Thymonucleic Acid. 1. The Preparation of Oligonucleotids.* J. Biol. Chem. (1951), *188*, p. 695—704; 705—715.

Loiseleur, J. şi Morel, R. *Sur le dosage de l'acide lactique dans le sang.* Bull. Soc. chim. Biol. (1930), *12*, p. 538—540.

Lisovskaia, N. P. şi Livanova, N. B. *Fosfoproteinî.* Moskva, Izd. Akademii Nauk S.S.S.R. (1960).

Loring, H.; Roll, P.; Pierce. *A simplified procedure for the preparation of cytidylic acid and diammonium uridylate from yeast nucleic acid.* J. Biol. chem. (1948), *174*, p. 729—734.

Ilwaine, T. C. *A buffer solution an for colorimetric comparison.* J. Biol. chem. (1921), *49*, p. 183—186.

Mc Ilvaine, H. *Biochemisty and the Central Nervous System.* London, I. A Churchill LTD (1959).

Mc Kay, D. K.; Seligson, D.; Jewett, W. R. *A photometric system for automatically reading concentration.* Clin. Chem. (1964), 10, p. 907—917.

Macarovici, C. Gh. *Manual de chimie analitică cantitativă. Gravimetrie.* Bucureşti, Editura tehnică (1966).

Macovschi, E. şi Sarmanioti, C. *Modificarea metodei G. Bertrand şi a tehnicii Bierri pentru dozarea glucozei.* Stud. şi Cercet. de Biochimie (1958), (I), *3*, p. 271—276.

Macovschi, E. şi Moldoveanu, N. *O simplificare a metodei Thunberg pentru determinarea activităţii dehidrazelor.* Stud. şi Cercet. Biochimie, (1958), (I), *4*, p. 389—392.

Mapson, L. W. şi Partridge, S. M. *Separation of substances related to Ascorbic Acid.* Nature, (1949). *164*, p. 479—480.

Margna, U. V. *K metodu opredelenia aktivnosti polifenoloxidazî v rastitelnom materiale.* Biohimia, (1964), *29*, p. 420—423.

Markham, R. şi Smith, T. *The structure of ribonuleic acids.* Biochem. J. (1952), *52*, p. 552—565.

Melnick, L. M. *Iron.* În: „Treatise an analytical chemistry" *Part. II. Analytical chemistry of the elements*, vol. 2. Edited by I. Kolthoff, P. J. Erling ed E. B. Sandell. Interscience Publishers. (1962).

Merejinskii, M. F. *Kliniceskaia biohimia.* Minsk, Gosizdat, S.S.S.R. (1956).

Mejbaum, W. *Über die Bestimmung kleiner Pentoseluengen insbesondere in Derivaten der Adenylsäure.* Zeitschr. Physiol. Chem. (1939), *258*, p. 117—120.

Mescova, N. P. şi Severin, S. E. *Praktikum po biohimii jîvotnîh.* Moskva, Gosizdat. În: „Sovetskaia Nauka" (1950).

Meyer, K. H.; Fischer, Ed. H.; Piquet, A. *Purification et cristallisation de la β-amylase de malt. Sur les enzymes amylolytiques.* În: „Helv. Chim. Acta" (1951), *34*, 1, p. 316—324.

Mihlin, D. M. *Bologhiceskoe okislenie.* Moskva, Izd. Akademii Nauk S.S.S.R., 1956.

Mohr, Fr. Ann. *97*, p. 335 (1856).

Moslov, V. V. şi Skarlat, I. V. *Kolorimetriceskoe opredelenie belka v rastitelnom materiale.* Prikl. biohimia i mikrobiol. (1965), *1*, 2, p. 233—237.

Mudr, J. Sonka. *Pentosy, Chemie, fysiologie a klinica.* Ed. Státni zdravotnické nakladatelstvi, Praha (1958).

Needham, J. şi Boell, E. J. *XVII. An ultramicro kjeldahl technique.* Biochem, J. 1939, *33*, p. 149—152.

Nelson, N. *A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose.* J. Biol. Chem. (1944), *153*, p. 375—380.

Neilands, J. şi Stumph, P. *Ocerki po himii fermentov.* Moskva, Izd. Innostrannoi literaturî (1958).

Nenițescu, C. D. *Chimie generală* (ediţia 2). Bucureşti, Editura tehnică (1963).

Neurath, H. şi Bailey, K. *The Proteins. Chemistry, Biological Activity and Methods.* Vol. I. Parts A. B. Academic Press. Inc. Publishers, New York (1953).

Noetling, G. şi Bernfeld, P. *Sur les enzymes amylolytiques. III. La β-amylase: dosage d'activité et contrôle de l'absence d'amylase.* Helv. Chim. Acta, (1948), *31*, p. 286—290.

Northrop, J. H. *Crystalline enzymes. The chemistry of pepsin, trypsin and bacteriophage.* Columbia Biological Series nr. 12, New York, Columbia University Prese (1939).

Northrop, D.; Kunitz, M.; Herriott, P. *Kristaliceskie fermentî.* Moskva, Izd. Innostrannoi literaturî (1950).

Olimpienko, G. S. *Aktivnosti katalazî, peroxidazî, polifenoloxidazî v listiah saharnoi sfeklî pod vlianiem mikroelementov.* Uc. Zap. Petrozavodskovo Universiteta (1964), *12*, 3, p. 76—81.

Panteleeva, N. S. *Razdelenie nukleotidov na okteole-ţelliuloze metodom tonkosloinoi hromatografii (TCX).* Vestnik Leningradskovo Universiteta (1964), *3*, p. 73—79.

Parker, C. A. *A method for the measurement of total nitrogen in microgram amounts.* Austral. J. Exptl. Biol. and Med. Sci (1962), *39*, nr. 6, p. 515—520.

Philips, R. A.; Van Slyke, D. D.; Hamilton, P. B.; Dole, V. P.; Emerson, K.; Prochibold, R. M. *Measurement of the specific gravities of Whole Blood and Plasma by Standard Copper Sulphate Solution.* J. Biol. Chem. (1950), *183*, p. 305—330.

Petrunikina, A. M. *Prakticeskaia biohimia.* Izdanie tretie, pererabotannoe. Moskva, Medghiz (1961).

Pîlnev, V. M. *Vakuum-infiltraţionnîi mikrometod opredelenia aktivnosti deghidraz v jivîh tkaneah.* Biohimia (1964), *29*, 5, p. 837—840.

Pratt, A. W.; Toal, J. N.; Rushizky, G. W.; Sober, H. A. *Spectral characterisation of oligonucleotides by computational methods.* Biochemistry (1964), *3*, p. 1831—1837.

Polianovski, O. L. *Roli funkţonalnîh grupp belka v fermentah. Osnovî molekulearnoi biohimii.* Moskva, Izd. Nauka (1964).

Rauen, H. M. şi Kuhn, R. *Biochemisches Taschenbuch.* Herausgegeben Springer-Verlag. Berlin, Göttingen. Heidelberg, (1956).

Reis, F. şi Chakmakjian, H. H. *Colorimetric method for cantitative determination of iron in blood in the form of dispersed prussian blue.* J. Biol. Chem. (1931), *92*, p. 59—63.

Roe, J. M. şi Rice, E. W. *A photometric method for the determination of free pentoses in animal tissues.* J. Biol. chem. (1948), *173*, p. 507—512.

Robinson, H. W. şi Hogden, C. G. *The biuret reaction in the determination of serum proteins. I. A study of the condition necessary for the production of a stable color which bears a quantitative relationship to the protein concentration.* J. Biol. chem. (1940) *135*, p. 707—725.

Rojkov, M. I. şi Smirnov, N. E. *Vitaminnîe rastenia.* Moskva, Pişcepromizdat, (1956).

Rona, P. şi Kleinmann, L. *Practikum der physiologischen Chemie.* Berlin, (1929).

Rosenheim, O. şi Drummond, P. C. *CXVI. A delicate colour reaction for the presence of vitamina A.* Biochem. J. (1925), *19*, p. 753—756.

Schweiger, A. şi Günther, H. *A comparison of two methods for the determining of lactic acid in muscle.* J. Food. Sci. (1964), *29*, 6, p. 708—813.

Skvirskaia, E. N. şi Cepinoga, O. P. *Praktikum po nukleoproteidam i nukleinovîh kislot.* Moskva, Izd. Vîşşaia şkola, (1964).

Shepherd, D. M. şi West, G. B. *Detection of Some Precursors of Andrenaline by Paper Chromatography.* Nature (1953), *171*, p. 1160.

Silverman, H. şi Gubernick, I. *Colorimetric determination of uric acid with alcaline ferricyanide.* J. Biol. chem. (1947), *167*, p. 363—368.

Schoenheimer, H. şi Sperry, W. *A micromethod for the determination of free and combined cholesterol.* J. Biol. Chem. (1934), *106*, p. 745—760.

Schmidt, D. G. şi Payens, T. A. J. *The purification and some properties of A Calcium-sensitive α-Cazein.* Biochem. Biophys Acta. (1963), *78*, p. 492—499.

Sela, M. (editor). *New perspectives in Biology.* Elsevier Publishing Company Amsterdam-London, New York, vol. 4, (1964).

Somogyi, M. *A method for the preparation of blood filtrates for the determination of Sugar.* J. Biol. Chem. (1930), *86*, p. 655—663.

Somogyi, M. *A new reagent for the determination of sugar.* J. Biol. Chem. (1945), *160*, p. 61—68.

Somogyi, M. *Determination of blood sugar.* J. Biol. Chem. (1945), *160*, p. 69—73.
Somogyi, M. *Notes an sugar determination.* J. Biol. Chem. (1952), *195*, p. 19—23.
Sobel, Ch. şi Fernandes, A. *Determination of chloride in serum and urine by a modified mercuric thiocyanate method.* Proc. Soc. Exptl. Biol. and Med. (1963), *113*, nr. 1, p. 187—188.
Sörensen, S. P. L. *Enzymstudien. II. Mitteilung. Über die Messung und die Bedeutung der Wasserstoffiolenkonzentration bei enzymatischen Prozessen.* Biochem. Z. (1909), *21*, p. 131—200.
Soru, E. *Biochimie medicală.* Vol. II. Bucureşti, Editura medicală (1963).
Spirin, A. S. *Spektrofotometriceskoe opredelenie summarnovo kolicestva nukleinovih kislot.* Biohimia (1958), *23*, 5, p. 656—662.
Stohl, A. T. şi Bennet, H. B. *A micro Method for the determination of Potasium as Iodoplatinate.* J. Biol. Chem. (1928), *78*, p. 643—651.
Sumner, J. B. şi Howell, S. F. *A method for determination of saccharase activity.* J. Biol. Chem. (1935), *108*, p. 51—54.
Sunderman, W. şi Williams, P. *Diminution in chloride measurement after Drying blood and tissues.* J. Biol. Chem. (1931), *92*, p. 99—107.
Suzuki Kunihiko. *A simple and accurate micromethod for quantitative determination of ganglioside patterns.* Life Sci. (1964), *3*, p. 1227—1233.
Szent-Györgyi, A. *Bioenergetica.* Bucureşti, Editura ştiinţifică (1962).
Taranova, N. P. *Videlenie i ocistka gangliozidov i opredelenie ih radioaktivnosti posle vvedenia* C^{14} Usp. med. himii (1964), *10*, 6, p. 624—627.
Taranova, N. P. *Soderjanie ţerebrozidov v golnovnom mozgu krîs razlicinovo vozrasta.* Vestnik Leningradskovo Universiteta, (1964), *9*, p. 97—101.
Tam Cian Ciau, Sitinskii, I. A. *Kolicestvennoe opredelenie saharov v klubneah razlicinih sortov batata.* Vestnik Leningradskovo Universiteta (1965), *3*, p. 87—90.
Talmud, B. A. şi Afanasiev, P. B. *Metod bîstroi mineralizaţii materialov jivotnovo i rastitelnovo proishojdenia dlea kolicestvennovo opredelenia azota.* Prikl. biohimia i mikrobiol. (1965), *1*, 2, p. 227—232.
Tamber, H.; Kleiner, I. S.; Mishkind, D. *Ascorbic acid (vitamina C) oxidase.* J. Biol. Chem. (1935), *110*, p. 211—217.
Thomas, P. *Manuel de Biochimie.* Paris, Ed. Masson et Cie (1936).
Trufanov, A. V. *Biohimia i fiziologhia vitaminov i antivitaminov.* Moskva, Selhozghiz (1959).
Tsuboi, K. K. şi Price, T. D. *Isolation, Detection and Measure of Microgram Quantities of Labeled Tissue Nucleotides.* Arch. Biochem Biophys. (1959), *81*, p. 223—237.
Tongur, V. S.; Leikina, E. M.; Kulikova, L. G. *Frakţionirovanie dezoxiribonukleoproteidov videlennîh iz peceni.* Biul. eksperim. biol i med. (1959), *4*, XLVII, p. 66—69.
Ţanev, R. G. şi Markov, G. G. *K voprosu o kolicestvennom spektrofotometriceskom opredelenii nukleinovoi kisloti.* Biohimia (1960), *25*, p. 150—159.
Van Slyke, D. D.; Mac Fadyen, D. A.; Hamilton, P. *Determination of free amino acids by Nitration of the carbon dioxide formed in the reaction with ninhidrin.* J. Biol. Chem. (1941), *141*, p. 671—680.
Van Slyke, D. D.; Phillips, R. A.; Dole, V. P.; Hamilton, P. B.; Archibald, R. M.; Plazin, J. *Calculation of Hemoglobin from blood specific gravities.* J. Biol. Chem. (1950), *183*, p 349, p. 360.
Van Slyke, D. D.; Dillon, R. T.; Mac Fadyen, D. A.; Hamilton, P. *Colorimetric determination of carboxyl groups in free amino acids.* J. Biol. Chem. (1941), *141*, p. 627—669.
Van Slyke, D. D.; Hiller, A.; Phillips, R. A.; Hamilton, P. B.; Dole, V. P.; Archibald, R. M.; Eder, H. A. *The Estimation of Plasma Protein Concentration from Plasma specific gravity.* J. Biol. Chem. (1950), *183*, p. 331—348.
Van Slyke, D. D. *Manometric determination of primary amino nitrogen and its application to blood analysis.* J. Biol. Chem. (1929), *83*, p. 425—447.

Vasilov, K. I. *K voprosu o roli fiziko-himiceskih metodov v biologhii i mediține na sovremennom etape.* Rostov-na-Donu, (1965), p. 3—6.

Venkstern, T. și Baev, A. A. *Spektrî pogloșcenia minornîh osnovanii, ih nukleozidov, nukleotidov i nekotorîh oligonuleotidov.* Moskva, Izd. „Nauka", 1965.

* * * *Vitaminî.* II. *Polucenie i ocistka vitaminov. Fiziologhia i biohimia vitaminov.* (Pod redakții A. V. Palladina). Kiev, Izd. Akad. Nauk Ukrainskoi S.S.S.R. (1956).

Vladimirov, G. E. și Lizlova, S. N. *Enzimologhia. Obșcie voprosî izucenia o fermentah.* Leningrad, Izd. Leningradskovo Universiteta (1962).

Vogl, A. I. *Practical Organic Chemistry including Qualitativ organic analysis.* Third edition. London, Colchester (Anglia) (1961).

Volkenstein, M. V. *Fermentî i biofizika.* „Molekulearnaia biologhia. Problemî i perspektivî". Moskva, Izd. „Nauka", (1964).

Vogel, A. I. *Elementary practical organic chemistry. Part. II. Qualitative organic analysis.* Ed. Lorgmans, London, Cholchester (1959), p. 478.

Weber, K. și Sund, N. *Zur Quartärstruktur der Katalase aus Rinderleber.* Angew. Chem. (1965), 77, p. 621.

Verle, E. și Koch, J. *Papierchromatographische Trennung von Tabakalcaloiden.* Naturwiss (1951), 88, p. 333.

West, E. S. *An improved lactic acid apparatus.* J. Biol. Chem. (1931), 92, p. 483—485.

Waguyen, Kim Bai, Pin Paul. *Phosphoprotéines végétales.* Compt. rend. Soc. biol. (1964), 158, 11, p. 2054—2056.

Winzler, R. *Determination of serum glucoproteins, in „Methods of biochimical analysis".* Edited by D. Glick. vol. II. Interscience publishers. Inc. New York, London, (1955), p. 290.

Zbarski, I. B. și Ermolaeva, L. P. *K harakteristike iadernîh nukleoproteidov nekotorîh tkanei.* Biohimia, (1960), 25, 1, p. 112—117.

Zonis, S. A. și Mazurov, S. M. *Laboratorno-lekționnîe opîti i demonstraționnîie materialî po organisceskoi himii.* Moskva, Gosizdat, Vîsșaia școla, (1961).

Bibliotecа Facultății de Chimie

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Lei 17,20

EDITURA DIDACTICĂ ȘI PEDAGOGICĂ – BUCUREȘTI, 1967

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY